

METABOLITKONZENTRATIONEN DES TRICARBONSÄUREZYKLUS
IM LEBERGEWEBE SCHWANGERER RATTEN

Rainer Roskopf

Mainz 1972

Aus der Universitäts-Frauenklinik Mainz
(Direktor: Professor Dr. V. Friedberg)

METABOLITKONZENTRATIONEN DES TRICARBONSÄUREZYKLUS
IM LEBERGEWEBE SCHWANGERER RATTEN

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät der
Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von
Rainer Rosskopf
aus Münster/Dieburg

Mainz 1972



Dekan: Prof.Dr. K.H.Bäßler
Referat: Prof.Dr.G.H.Rathgen
Korreferat: Prof.Dr.V.Friedberg

Für die Überlassung des Themas, die freundliche Hilfe und die wertvollen Hinweise bei der Anfertigung vorliegender Arbeit bin ich Herrn Prof.Dr.G.H.Rathgen zu besonderem Dank verpflichtet.

Ebenso danke ich Frau Dr. Ehrenberg-Kieckebusch für die Hilfe und Beratung bei der statistischen Auswertung.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Verzeichnis der Werke

1. Einleitung

2. Methodik

3. Technik

4. Statistische Methode

5. MEINER FRAU UND MEINEN ELTERN

6. Technik

7. Statistik

8. Methodik

9. Technik

10. Statistik

Inhaltsverzeichnis

	Seite
A. Einleitung	1
B. Methodik	2
C. Testansätze	9
D. Statistische Tests	15
I. Korrelationskoeffizient	15
II. Varianzanalyse	15
E. Ergebnisse	16
F. Diskussion	28
G. Zusammenfassung	46
H. Literaturverzeichnis	47

A. EINLEITUNG

Funktionelle und morphologische Untersuchungen der Leber als zentralem Stoffwechselorgan in der Schwangerschaft liegen in größerer Anzahl vor.

Bei diesen Studien wurden keine größeren Abweichungen von der Norm gefunden (34). Der Blutstrom durch die Leber, das Leberminutenvolumen (39) und ein durch Isotopenuntersuchungen festgestellter erhöhter Umsatz des Kernmaterials der Leberzellen waren immer im Bereich des Physiologischen (12).

Diese morphologischen und funktionellen Betrachtungen können allerdings nichts Definitives über eventuelle biochemische Veränderungen der verschiedenen Stoffwechselvorgänge in der Leber während der Schwangerschaft aussagen. Die Kenntnisse über intermediäre Stoffwechselvorgänge in der Leber könnten uns jedoch einen Einblick über die durch die Gestation bedingten klinischen Erscheinungen geben.

Speziell beim Kohlenhydratumsatz der Leber trächtiger Ratten haben Untersuchungen von RATHGEN und Mitarbeiter signifikante Änderungen der Enzymaktivitäten und der stationären Konzentration einiger Metaboliten erbracht.

Von diesen Untersuchungen ausgehend haben wir uns die Frage gestellt, inwieweit diese durch die Gestation bedingten Veränderungen auch auf den Tricarbonsäurezyklus zutreffen, zumal hier außer dem Eiweiß- und Fettstoffwechsel der Kohlenhydratstoffwechsel ebenfalls einmündet.

Wir haben in unseren Untersuchungen die stationäre Konzentration von Metaboliten im Tricarbonsäurezyklus bei trächtigen und nicht trächtigen Ratten festgestellt, um uns hieraus ableitend weitere Vorstellungen über die biochemischen Veränderungen im Stoffwechsel machen zu können.

B. Methodik

1. Verwendete Abkürzungen

Enzyme:

G1DH	=	Glutamat-Dehydrogenase
ICDH	=	Isocitrat-Dehydrogenase
LDH	=	Lactat-Dehydrogenase
MDH	=	Malat-Dehydrogenase

Nucleotide:

NAD	=	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (= DPN-Diphosphopyridinnukleotid)
NADH	=	reduzierte Form des NAD (= DPNH)
NADP	=	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (= TPN-Trisphosphopyridinnukleotid)
NADPH	=	reduzierte Form des NADP (= TPNH)

Metaboliten des Tricarbonsäurezyklus:

Acetyl-CoA	=	Acetyl-Coenzym A
α -KGS	=	α -Ketoglutarsäure

2. Weitere Abkürzungen

EDTA	=	Äthylendiamin-tetraacetat
TRAP	=	Triäthanolamin-Puffer
Trilon	=	neutralisiertes EDTA
Tris	=	Tris-hydroxymethyl-aminomethan

3. Verwendete Präparate

Sämtliche Lösungen wurden in dreifach destilliertem Wasser, die beiden letzten Stufen wurden aus einer Quarzapparatur gewonnen, angesetzt.

Die Präparate: Citrat-Lyase, Citrat-Synthase, Fumarase
G1DH, ICDH, LDH, MDH,
NAD, NADH, NADP

wurden von der Fa. C.F.Boehringer, Mannheim, bezogen.

Hydrazin, Hydrazin-Glykokoll, Malat

EDTA, TRAP, TRIS, $MgSO_4$, $MnSO_4$, $(NH_4)_2SO_4$, $ZnCl_2$
wurden von der Firma E. Merck, Darmstadt, bezogen.

4. Reagentien

NAD	ca. $2,5 \times 10^{-2}$ M	Malat	0,2 M
NADH	ca. $2,4 \times 10^{-2}$ M	Citrat-Synthase	2 mg Protein/ml
NADP	3×10^{-2} M	Citrat-Lyase	5 mg Protein/ml
$MnSO_4$	0,01 M	LDH	5 mg Protein/ml
$ZnCl_2$	4%ige Lsg.	MDH	5 mg Protein/ml
$(NH_4)_2SO_4$	0,05 M	G1DH	10 mg Protein/ml
Trilon	0,26 M	Fumarase	2 mg Protein/ml
EDTA	0,05 M		
Hydrazin	1,6 M	ICDH	10 mg Protein/ml
$MgSO_4$	0,1 M	Tris-Puffer pH 8,25	0,1 M
		Hydrazin-Glykokoll-Puffer pH 9,0	(0,5 M Glycin; 0,4 M Hydrazin)
		Hydrazin-Glykokoll-Puffer pH 9,5	(0,4 M Hydrazin; 1 M Glycin)
		Trap-Puffer pH 7,6	0,1 M

Bemerkungen zur Methodik:

a) Homogenisierungstechnik

Den Pistill-Homogenisator nach Potter-Elvehjem konnten wir für unsere Versuchszwecke nicht nehmen, da die zu untersuchenden Substrate mit dieser Methode quantitativ nicht vollständig in den Überstand übergehen können. Wir verwendeten daher ein Ultra-Turrax-Gerät mit einer Drehzahl von 14.000 U/Min. und haben 4 x 30 Sec. unter Eiskühlung homogenisiert. Dieses Verfahren eignet sich deshalb so gut, da bei dieser Drehzahl ein vollkommener Zellaufschluß erreicht wird (2).

b) Störfaktoren

Um den Bindegewebsanteil des Lebergewebes so gering wie möglich zu halten, wurde die Leber an ihrer Lappengrenze sorgfältig vom Bindegewebe freipräpariert. Die erhaltenen Substratkonzentrationen beziehen sich also in erster Linie auf den parenchymalen Anteil der Leber.

Der mesenchymale Zellanteil, das Gefäßendothel und das Gallengangsendothel, ist wohl zahlenmäßig bedeutungsvoll, jedoch nicht in bezug auf das Cytoplasma und bleibt hier unberücksichtigt (62).

c) Optimale Reaktionsbedingungen

Für die Reaktionsansätze ermittelten wir in Vorversuchen die optimalen Bedingungen, da die in der Literatur angegebenen Testansätze und die Konzentration ihrer Reaktionspartner nicht immer für unsere Versuche diesen Bedingungen entsprachen.

Versuchstiere

Für sämtliche Untersuchungen wurden weibliche Ratten des SPRAGUE-DAWLEY-Stammes verwendet, deren Tragzeit nach HAGEMANN (23) durchschnittlich 22 Tage und 14 1/2 Std. beträgt.

Der jeweilige Zeitpunkt der Gravidität wurde nach HENNEBERG (27) aus der durchschnittlichen Foetenlänge bestimmt.

Wir fanden bei den einzelnen Versuchstieren zwischen 4 und 23 Foeten, deren Längen sich zwischen 0,3 mm und 45 mm bewegten. Das Gewicht der trächtigen Ratten lag zwischen 250 und 460 g, das der normalen Versuchstiere zwischen 150 und 380 g.

Die Tiere wurden mit Altromin-Standarddiät ernährt, erhielten jedoch in den letzten 6 bzw. 12 Stunden vor Versuchsbeginn nur noch Wasser ad libitum.

Herstellung des Leberhomogenates

Die Ratten wurden mit Aether leicht betäubt, der Peritonealraum längs eröffnet und die Leber sorgfältig freigelegt. Danach wurde die Leber am Hilus abgetrennt und sofort in flüssigen Stickstoff gebracht. Der Vorteil dieser Methode beruht darauf, daß man genügend Lebergewebe für das Homogenat besitzt. Eine Verfälschung der Substratkonzentrationen in der Leber ist kaum anzunehmen, da die Abtrennung am Hilus und das Einfrieren des Lebergewebes schnellstens geschah. Es ist also ein sofortiger Stop der Durchblutung und der Stoffwechselaktivitäten in der Leber gewährleistet. Das gefrorene Lebergewebe wurde auf einer Neigungsbalkenwaage gewogen und in ein dickwandiges Reagenzglas gegeben, in das wir 2 ml eiskalte 0,61 M HClO_4 vorgegeben hatten.

Danach homogenisierten wir unter Eiskühlung sofort das Lebergewebe mit einem Ultra-Turrax-Homogenisator 4 x 30 Sek. Das Homogenat wurde anschließend bei 20 000 U/Min. und 0° C zentrifugiert. Der klare Überstand wurde in vorgekühlte Gläser dekantiert und das zurückgebliebene Sediment nochmals mit 5%iger

Perchlorsäure gewaschen, so daß wir eine Gesamtverdünnung Perchlorsäure/Lebergewebe von 3:1 erhielten. Beide Überstände wurden vereinigt.

Die jeweils optimalen pH-Werte für die einzelnen zu bestimmenden Substrate wurden durch Titration mit 5 M K_2CO_3 unter Eiskühlung und gutem Durchmischen mit einem Glasstempel eingestellt.

Der Endpunkt der Titration wurde durch Tüpfeln auf Indikatorpapier (Merck Spezialindikator) am Farbumschlag erkannt. Der nunmehr durch Abzentrifugieren des ausfallenden $KClO_4$ erhaltene klare Überstand wurde direkt zum Test verwendet.

Korrektur des Restblutgehaltes

Bei der Bestimmung von Metabolitkonzentration in der Leber muß man den Blutgehalt des Organs mitbestimmen, damit man, wenn die Konzentration der zu bestimmenden Substanz nicht identisch mit der Konzentration im blutfreien Organ ist, keine falschen Werte bekommt.

Deshalb wird einerseits die zu erfassende Substanz im Blut und andererseits in der bluthaltigen Leber bestimmt und man kann so, bei Kenntnis des Blutgehaltes der analysierten Leberprobe, die Konzentration der Substanz im blutfreien Lebergewebe berechnen. Die Bestimmung der Substanzen des Tricarbonsäurezyklus im Vollblut der Tiere erfolgte in gleicher Weise wie in der Leber. Das Blut wurde nach Durchtrennung des Leberhilus mit einer Pipette (0,02 ml) aufgezogen und ein abgetrenntes Stück bluthaltiges Lebergewebe in ein zuvor gewogenes Reagenzglas mit 5 ml Cyanhämiglobin-Lösung gegeben. Danach wurde dieses Reagenzglas mit dem Lebergewebe nochmals gewogen und aus der erhaltenen Differenz das tatsächliche Lebergewicht bestimmt. Dieses bluthaltige Lebergewebe wurde mit einem Ultra-Turrax homogenisiert und anschließend bei 10 000 U/Min. 30 Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, davon 0,5 ml mit 5 ml Cyanhämiglobin-Lösung gemischt und im Photometer Eppendorf bei einer Wellenlänge von 546 nm der Hämoglobingehalt bestimmt.

Der Hb-Gehalt des Blutes wurde nach Mischen von 0,02 ml Blut in 5 ml Cyanhäoglobin-Lösung ebenfalls im Photometer Eppendorf bei 546 nm bestimmt. Damit waren die Voraussetzungen für die Berechnung des Blutgehaltes der Leberprobe nach folgender Formel gegeben:

$$\frac{\Delta E \text{ Hb-Leber} \cdot \text{Verd.} \cdot 0,02 \text{ ml}}{\text{Leberprobe in Gramm} \cdot \Delta E \text{ Hb Blut}} = \text{ml Blut/g Leber}$$

(Verd. = Gesamtverdünnung des Überstandes vom Lebergewebe.)

Die korrigierten Werte, also der tatsächliche Gehalt der Substanz im blutfreien Lebergewebe, konnte man, nachdem die Substratkonzentration im Blut und im bluthaltigen Lebergewebe sowie der jeweilige Blutgehalt der Leberprobe bekannt war, nach der Formel:

$$\text{Mol/g FG Leber} - \text{Mol/ml Blut} \times \text{ml Blut/g Leber}$$

errechnen.

Wir konnten mit unseren Nachweismethoden nur Acetyl-CoA und Citrat im Vollblut der Ratten nachweisen. Die korrigierten Werte beziehen sich also lediglich auf diese beiden Substrate. In den folgenden Tabellen ist dies bei Acetyl-CoA und Citrat berücksichtigt, aber nicht mehr gesondert angegeben.

Konzentrationsbestimmungen einiger Metaboliten des Tricarbon-säurezyklus

Alle Metabolitkonzentrationen wurden im optischen Test nach WARBURG (64) gemessen. Die Registrierung von Extinktionsänderungen durch Pyridinnukleotide, die an einer enzymatischen Reaktion teilnehmen, ist die Grundlage dieses optischen Testes. Für die Konzentrationsbestimmungen von Acetyl-CoA, Citrat, Fumarat, Glutamat, α -KGS und Malat wurde das Coenzym NAD, für Isocitrat das Coenzym NADP sowie deren reduzierte Formen NADH bzw. NADPH benutzt.

Da der maximale Absorptionsbereich der reduzierten Coenzyme in einem Wellenbereich von 340 nm liegt, das Absorptionsmaximum der oxydierten Coenzyme aber nicht in diesen Wellenbereich von 300-400 nm fällt, kann man zahlreiche NAD- und NADP-abhängige enzymatische Reaktionen aufgrund der jeweiligen Extinktionsänderungen photometrisch bestimmen.

Die Extinktionsänderungen wurden im Photometer EPPENDORF mit einem Registriergerät gemessen. Die Reaktionsansätze wurden bis auf Isocitrat in 10 mm Küvetten bei 25°C und 334 nm getestet. Isocitrat wurde unter den gleichen Bedingungen in Halbmikroküvetten mit d = 5 mm gemessen.

Die Messungen wurden so lange registriert, bis keine Extinktionsänderungen (ΔE) mehr aufgezeichnet wurden. Der "Nachstart" mit einer definierten Menge Substrat nach Beendigung der Bestimmungen bietet eine Kontrollmöglichkeit für das Funktionieren des Testes und läßt erkennen, daß nicht andere Faktoren als die zu testenden Substrate limitierend wirken.

Als Maß für die Metabolitkonzentrationen diene der Umsatz NAD bzw. NADP, der nach der Formel

$$\frac{\Delta E \cdot V}{334 \cdot d} = \text{Mol/ml Überstand}$$

berechnet wurde. Alle Metabolitkonzentrationen wurden in Mol, bezogen auf g/FG Leber, angegeben.

Nach HOHORST et al. (28) spricht man dann vom Metabolitgehalt eines Gewebes, wenn der Analysenwert auf das Frischgewicht (FG) des betreffenden Gewebes bezogen wird. Die Verteilung des Metaboliten innerhalb des Gewebes auf verschiedene Zelltypen, auf den interstitiellen Raum, bleibt unberücksichtigt.

C. Testansätze

Für alle Tests wurden folgende Bedingungen eingehalten:

Temperatur: 25°C.

Wellenlänge der Meßstrahlung: 334 nm

Registrierbereich des Schreibers: 0 - 1

Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes für Isocitrat: 5 ml

für Glutamat, Citrat, α -KGS, Fumarat, Acetyl-CoA: 3 ml

und für Malat: 2 ml

Schichtdicke bei Isocitrat: 5 mm

bei allen anderen Substraten: 10 mm

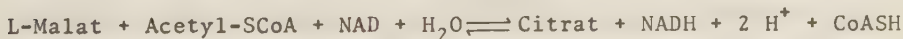
Überstände, Hilfsfermente und Substrate standen während der Messung im Eisbad.

Den Testansätzen liegen Angaben von Bergmeyer (2) zugrunde.

In Vorversuchen wurde für jedes Substrat die optimalen Konzentrationen der Reaktionspartner bestimmt.

a) Acetyl-CoA-Bestimmung

Die Acetyl-CoA-Bestimmung wurde in einem zusammengesetzten optischen Test nach folgender Gleichung bestimmt:



Um eine quantitative Umsetzung von Acetyl-CoA zu gewährleisten, wählten wir einen pH-Wert von 8 bis 8,5.

<u>Testansatz:</u>	Leberhomogenat-Überstand	0,5 ml
	Malat $6,6 \times 10^{-6}$ M/ml Reaktionsansatz	
	NAD $4,16 \times 10^{-7}$ M/ml	
	Citrat-Synthase (2 mg Protein/ml)	0,01 ml
	MDH (5 mg Protein/ml)	0,01 ml
	Tris-Puffer 0,1 M; pH 8,25 ad	3 ml

Die Reaktion wurde mit MDH gestartet.

Der gleiche Ansatz wurde auch für die Acetyl-CoA-Bestimmung im Blut angewandt. Anstatt 0,5 ml Überstand wurde 0,5 ml Blut eingesetzt.

b) Citrat-Bestimmung

Die Spaltung von Citrat in Oxalacetat und Acetat wird von der Citrat-Lyase katalysiert (1). Für die Aktivität der Citrat-Lyase ist die Anwesenheit von Zn^{++} erforderlich.



Oxalacetat wird durch die Anwesenheit von Oxalacetat-Decarboxylase im Pyruvat und CO_2 gespalten (2).



Da es möglich ist, daß eine Spur von Oxalacetat nicht in Pyruvat gespalten wird, muß man durch Zugabe von MDH Oxalacetat enzymatisch reduzieren.

Diese Reaktionsfolge wird mit der Reduktion von Pyruvat durch NADH und LDH gekoppelt (3).



Bei einem Überschuß von NADH läuft die Reaktion schnell ab und überführt Pyruvat quantitativ in Lactat. Gemessen wird die Abnahme der NADH-Extinktion.

Testansatz:

Leberhomogenat-Überstand		0,5 ml
$ZnCl_2$	(4%ige Lösung)	0,05 ml
LDH	(5 mg Protein/ml)	0,005 ml
MDH	(5 mg Protein/ml)	0,05 ml
Citrat-Lyase	(5 mg Protein/ml)	0,01 ml
NADH	4×10^{-7} M/ml Reaktionsansatz	
Trap-Puffer	0,1 M, pH 7,6	ad 3 ml

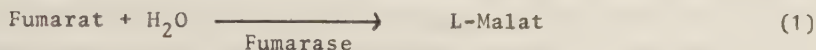
Die Reaktion wurde mit Citrat-Lyase gestartet.

Der gleiche Ansatz wurde auch für die Citrat-Bestimmung im Blut angewandt. Anstatt 0,5 ml Überstand wurde 0,5 ml Blut eingesetzt.

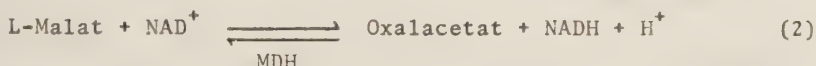
c) Fumarat-Bestimmung

Prinzip:

Fumarase katalysiert die reversible Hydratation von Fumarat zu Malat, wobei Fumarat vollständig in Malat übergeht (1).



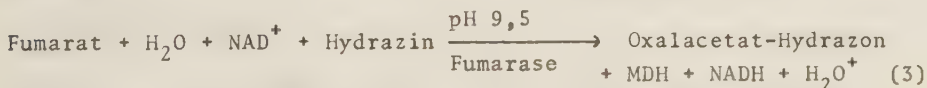
Malat-Dehydrogenase (MDH) katalysiert die Oxydation von Malat zu Oxalacetat durch NAD (2).



Das Gleichgewicht der Reaktion liegt weit auf der linken Seite, so daß eine quantitative Oxydation von L-Malat nur möglich ist, wenn die Reaktionsprodukte aus dem Gleichgewicht entfernt werden.

Die Protonen wurden durch ein alkalisches Reaktionsmedium abgefangen und das Oxalacetat durch Bindung an ein Hydrazon-Derivat aus der Reaktion entfernt. Eine quantitative Umwandlung von Fumarat ist dann möglich (3).

Die dem optischen Test zugrunde liegende Gleichung lautet demnach:



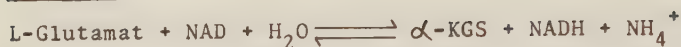
Testansatz:

Leberhomogenat-Überstand		0,5 ml
Fumarase	(2 mg Protein/ml)	0,02 ml
MDH	(5 mg Protein/ml)	0,01 ml
MgSO ₄	0,33 x 10 ⁻⁵ M/ml Reaktionsansatz	
EDTA	0,16 x 10 ⁻⁵ M/ml Reaktionsansatz	
Hydrazin	0,26 x 10 ⁻³ M/ml Reaktionsansatz	
NAD	4,16 x 10 ⁻⁷ M/ml Reaktionsansatz	
Hydrazin-Glykokoll-Puffer pH 9,5	ad	3 ml
(0,4 M Hydrazin, 1 M Glycin)		

Die Reaktion wurde mit NAD gestartet.

d) Glutamat-Bestimmung

Prinzip:



G1DH katalysiert diese Reaktion.

Da das Gleichgewicht der Reaktion weit auf der linken Seite liegt, muß man α -KGS mit Hydrazin abfangen, ein großer Überschuß von NAD vorhanden sein und im alkalischen Milieu (pH 9) die Reaktion ablaufen lassen, damit L-Glutamat quantitativ in α -KGS übergeht.

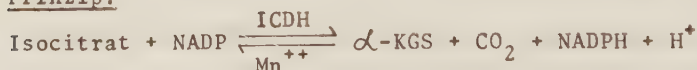
Testansatz:

Leberhomogenat-Überstand		0,5 ml
NAD	$1,6 \times 10^{-7}$ M/ml Reaktionsansatz	
G1DH	(10 mg Protein/ml)	0,02 ml
Hydrazin-Glykokoll-Puffer pH 9,0	ad	3 ml
(0,5 M Glycin, 0,5 M Hydrazin)		

Die Reaktion wurde mit G1DH gestartet.

e) Isocitrat-Bestimmung

Prinzip:



Die Reaktion wird von ICDH in Anwesenheit von Mn^{++} katalysiert. Das Gleichgewicht liegt weit auf der rechten Seite. Wir fanden in Vorversuchen den optimalen Reaktionsablauf bei einem pH von 7,6.

Testansatz:

Leberhomogenat-Überstand		3 ml
NADP	6×10^{-7} M/ml Reaktionsansatz	
MnSO_4	$0,2 \times 10^{-7}$ M/ml Reaktionsansatz	
ICDH	(10 mg Protein/ml)	0,005 ml
Trap-Puffer 0,1 M, pH 7,6	ad	5 ml

Gestartet wurde mit ICDH.

f) α -KGS-Bestimmung

Prinzip:



Die Reaktion wird von G1DH katalysiert.

α -KGS wird bei einem Überschuß von NH_4^+ -Ionen und NADH quantitativ in Glutamat übergeführt. Pro Mol α -KGS wird 1 Mol NADH oxydiert.

Testansatz:

Leberhomogenat-Überstand			0,5 ml
NADH	4	$\times 10^{-7}$ M/ml Reaktionsansatz	
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	8,5	$\times 10^{-7}$ M/ml Reaktionsansatz	
Trilon	1,73	$\times 10^{-6}$ M/ml Reaktionsansatz	
G1DH	(10 mg Protein/ml)		0,02 ml
Trap-Puffer	0,1 M, pH 7,6	ad	3 ml

Die Reaktion wurde mit 0,5 ml Leberhomogenat-Überstand gestartet.

g) Malat-Bestimmung

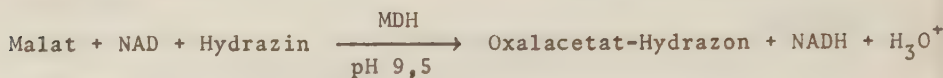
Prinzip:

Malat-Dehydrogenase (MDH) katalysiert die Dehydrierung von L-Malat durch NAD



Das Gleichgewicht der Reaktion liegt weit auf der linken Seite. Um eine quantitative Dehydrierung von L(-)Malat zu erreichen, müssen die Reaktionsprodukte aus dem Gleichgewicht entfernt werden. Protonen werden durch ein alkalisches Reaktionsmedium gebunden, Oxalacetat wird als Hydrazon abgefangen.

Die dem optischen Test für L(-)Malat zugrunde liegende Gleichung lautet demnach:



Testansatz:

Leberhomogenat-Überstand		0,5 ml
NAD	$14,5 \times 10^{-7}$ M/ml Reaktionsansatz	
MDH	(5 mg Protein/ml)	0,02 ml
Hydrazin-Glykokoll-Puffer	pH 9,5	ad
	(1 M Glycin, 0,4 M Hydrazin)	
		2 ml

Die Reaktion wurde mit MDH gestartet.

D. STATISTISCHE TESTS

I. Korrelationskoeffizient

Mit der Berechnung des Rangkorrelationskoeffizienten (r) wurde geprüft, ob eine Abhängigkeit aller untersuchten Substratkonzentrationen im Lebergewebe von Ratten

a) vom Gewicht

b) von der Foetenlänge (Dauer der Trächtigkeit)

besteht.

Aus n Wertpaaren (x = Länge der Foeten in mm,

y = Substratkonzentration)

wurde der Korrelationskoeffizient berechnet (75).

II. Varianzanalyse

Die Frage nach einem Unterschied der Substratkonzentration in der Leber zwischen trächtigen und nicht trächtigen Ratten und zwischen Ratten, die 6 und 12 Stunden gehungert haben, untersuchten wir mit der Varianzanalyse.

Die für die Varianzanalyse vorausgesetzte Normalverteilung wurde mit Hilfe des Wahrscheinlichkeitsnetzes geprüft. Die Varianzanalyse dient zum gleichzeitigen Vergleich mehrerer Mittelwerte. Sie arbeitet mit 2 Schätzwerten, von denen der erste auf der Streuung innerhalb der einzelnen Gruppen, der zweite auf der Streuung zwischen Gruppenmittel fußt.

Ist der Unterschied zwischen den Mittelwerten signifikant größer als die Schätzung der Varianz innerhalb der Gruppen, dann sind die Mittelwerte daran schuld, d.h., die Mittelwerte weichen mehr voneinander ab, als man es aufgrund des Zufalls in der Auslese der Gruppen erwarten kann. Man betrachtet daher immer das Verhältnis Varianz zwischen den Gruppen (MAQ zwischen): Varianz innerhalb der Gruppen (MAQ innerhalb).

Der daraus resultierende Quotient F ist unsere Prüfgröße und wird in der entsprechenden Tafel nachgeschaut.

E. ERGEBNISSE

Datenbeschreibung

In der Datenbeschreibung sind Fallzahlen, Mittelwerte und Standardabweichungen für alle trächtigen und nicht trächtigen Tiere bei 6 und 12 Std. Hunger für alle untersuchten Metabolitkonzentrationen enthalten.

Tab. 1

trächtige Tiere mit 6 Std. Hungerzeit				nicht trächtige Tiere mit 6 Std. Hungerzeit		
Substrat	n	$\bar{x}$	$\pm s$	n	$\bar{x}$	$\pm s$
Malat	25	392,64	103,59	12	315,31	55,78
Isocitrat	24	15,59	4,70	13	11,77	3,00
α -KGS	24	208,10	94,31	14	140,29	41,96
Glutamat	22	356,69	94,22	7	360,15	95,93
Fumarat	25	269,16	76,88	12	169,60	39,00

Tab. 2

trächtige Tiere mit 12 Std. Hungerzeit				nicht trächtige Tiere mit 12 Std. Hungerzeit		
Substrat	n	$\bar{x}$	$\pm s$	n	$\bar{x}$	$\pm s$
Malat	10	468,73	101,43	10	415,92	107,10
Isocitrat	10	29,55	9,03	10	24,16	5,73
α -KGS	10	228,36	48,38	10	245,65	81,27
Glutamat	10	349,22	116,40	10	282,72	102,03
Fumarat	10	409,39	132,34	10	347,08	113,17
Acetyl-CoA	13	371,85	89,49	13	405,30	89,15
Citrat	14	111,61	79,58	13	85,56	49,43

n = Fallzahl

$\bar{x}$ = Gruppenmittel (10^{-9} M/g FG), FG = Frischgewicht Leber

s = Standardabweichung

Varianzanalysentabellen

Tab. 3: Metabolitkonzentrationen in der Leber trächtiger und nicht trächtiger Ratten bei einer Nahrungskarenz von 6 Std. in 10^{-9} M/g FG.

Substrat	Streuungs- ursache	SAQ	f	MAQ	F	Testergeb- nis
Malat	zwischen den Gruppen	48483,19	1	48483,19	5,80	+
	innerhalb der Gruppen	292374,05	35	8353		
	insgesamt	340857,24	36			
Isocitrat	zwischen den Gruppen	123,17	1	123,17	6,95	+
	innerhalb der Gruppen	620,02	35	17,71		
	insgesamt	743,19	36			
α -KGS	zwischen den Gruppen	40657,76	1	40657,76	6,42	+
	innerhalb der Gruppen	227836,56	36	6328,79		
	insgesamt	268494,32	37			
Glutamat	zwischen den Gruppen	63,45	1	63,45	0,0069	-
	innerhalb der Gruppen	247663,26	27	9172,71		
	insgesamt	247726,71	28			
Fumarat	zwischen den Gruppen	80382,71	1	80382,71	17,67	++
	innerhalb der Gruppen	159133,81	35	4546,68		
	insgesamt	239516,52	36			

SAQ = Summe der Abweichungsquadrate

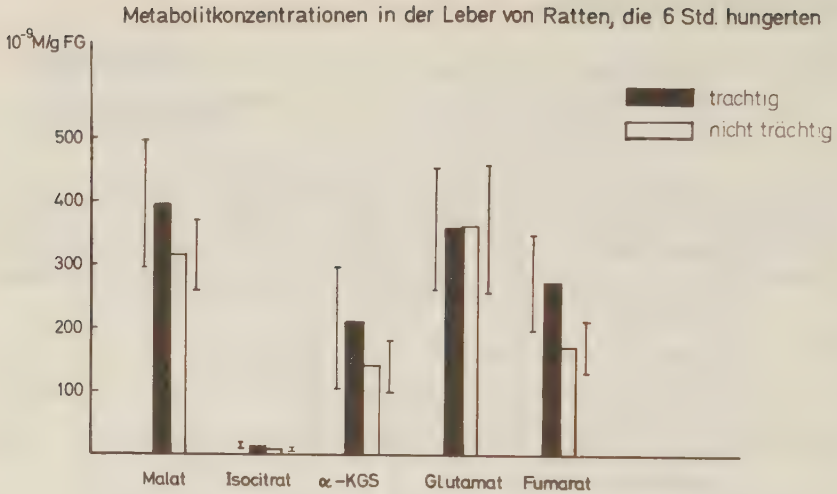
MAQ = mittlere Abweichungsquadrate

f = Freiheitsgrad

F = Testgröße

+ = 5 % Niveau = statistisch auffällig

++ = 1 % Niveau = statistisch signifikant



I = Standardabweichung

Abb. 1: Metabolitkonzentrationen in der Leber von Ratten, die 6 Std. hungerten.

Wie aus Tab. 3 und Abb. 1 zu ersehen ist, ergab sich für Malat, Isocitrat und α -KGS eine auffällige Konzentrationserhöhung während der gesamten Trächtigkeit bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 5 %.

Die Fumarat-Konzentration zeigte während der Trächtigkeit eine signifikante Zunahme mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 1 %.

Bei Glutamat konnte kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden.

Tab. 4: Metabolitkonzentrationen in der Leber trächtiger und nicht trächtiger Ratten, die 12 Stunden hungerten, in 10^{-9} M/g FG.

Substrat	Streuungs- ursache	SAQ	f	MAQ	F	Testergeb- nis
Malat	zwischen den Gruppen	13944,48	1	13944,48	1,28	-
	innerhalb der Gruppen	195874,63	18	10881,92		
	insgesamt	209819,11	19			
Isocitrat	zwischen den Gruppen	144,99	1	144,99	2,53	-
	innerhalb der Gruppen	1030,55	18	57,25		
	insgesamt	1175,54	19			
α -KGS	zwischen den Gruppen	1494,72	1	1494,72	0,33	-
	innerhalb der Gruppen	80534,68	18	4474,14		
	insgesamt	82029,40	19			
Glutamat	zwischen den Gruppen	22111,25	1	22111,25	1,84	-
	innerhalb der Gruppen	215700,31	18	11983,35		
	insgesamt	237811,56	19			
Fumarat	zwischen den Gruppen	19412,68	1	19412,68	1,28	-
	innerhalb der Gruppen	272956,20	18	15164,23		
	insgesamt	292368,88	19			
Acetyl-CoA	zwischen den Gruppen	7271,20	1	7271,20	0,91	-
	innerhalb der Gruppen	191509,79	24	7979,57		
	insgesamt	198780,99	25			
	zwischen den Gruppen	4574,72	1	4574,72	1,04	-
	innerhalb der Gruppen	109603,15	25	4384,12		
	insgesamt	114177,87	26			

Wie aus Tab. 4 zu entnehmen ist, zeigten keine der aufgeführten Metabolitkonzentrationen signifikante Unterschiede.

Tab. 5: Metabolitkonzentrationen in der Leber von nicht trächtigen Ratten bei 6 Std. Hunger, gegenüber den gefundenen Metabolitkonzentrationen nicht trächtiger Ratten bei 12 Std. Hunger, in 10^{-9} M/g FG.

Substrat	Streuungs- ursache	SAQ	f	MAQ	F	Testergeb- nis
Malat	zwischen den Gruppen	55205,80	1	55205,80	8,01	+
	innerhalb der Gruppen	137735,58	20	6886,77		
	insgesamt	192941,38	21			
Isocitrat	zwischen den Gruppen	867,96	1	867,96	44,95	++
	innerhalb der Gruppen	405,48	21	19,30		
	insgesamt	1273,44	22			
α -KGS	zwischen den Gruppen	64743,58	1	64743,58	17,22	++
	innerhalb der Gruppen	82672,12	22	3757,82		
	insgesamt	147415,70	23			
Glutamat	zwischen den Gruppen	24691,84	1	24691,84	2,46	-
	innerhalb der Gruppen	149960,46	15	9997,36		
	insgesamt	174652,30	16			
Fumarat	zwischen den Gruppen	171813,69	1	171813,69	26,51	++
	innerhalb der Gruppen	129616,93	20	6480,84		
	insgesamt	301430,62	21			

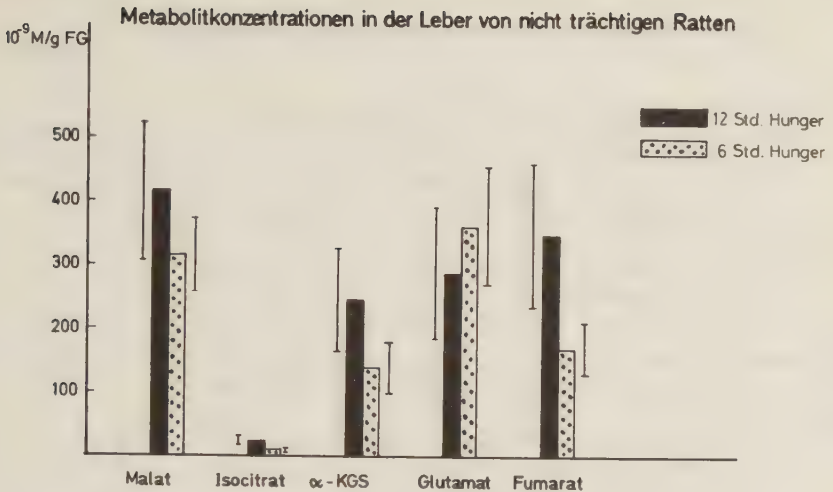


Abb. 2: Metabolitkonzentrationen in der Leber von nicht trächtigen Ratten mit 6- bzw. 12-stündiger Hungerzeit.

Es zeigte sich, wie aus Tab. 5 und Abb. 2 zu entnehmen ist, bei 12-stündigem Hungern der Ratten gegenüber 6-stündigem Hungern eine auffällige Zunahme der Malatkonzentration im Lebergewebe bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 5 % und eine signifikante Zunahme der Isocitrat-, α -KGS- und Fumarat-Konzentration im Lebergewebe mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 1 %.

Glutamat zeigte weder eine signifikante Zunahme noch eine signifikante Abnahme seiner Konzentration.

Acetyl-CoA ist weder in der Tabelle noch in der Zeichnung angeführt, da sich die Werte von Acetyl-CoA im Gegensatz zu den anderen Metaboliten auf das bluthaltige Lebergewebe beziehen. Wir haben wohl Acetyl-CoA im Blut bestimmt, aber der korrigierte Wert wich in seiner Größenordnung nicht von dem unkorrigierten Wert ab. Es genügt für unsere Fragestellung sowie auch für die Aussage, daß der Acetyl-CoA-Spiegel bei Normal-Ratten mit 12-stündigem Nahrungsentzug gegenüber einem Nahrungsentzug von 6 Stunden um eine Zehnerpotenz angestiegen ist.

Tab. 6: Metabolitkonzentrationen in der Leber trächtiger Ratten,
die 6 Std. bzw. 12 Std. hungerten, in 10^{-9} M/g FG.

Substrat	Streuungs- ursache	SAQ	f	MAQ	F	Testergeb- nis
Isocitrat	zwischen den Gruppen	1368,06	1	1368,06	35,44	++
	innerhalb der Gruppen	1235,21	32	38,60		
	insgesamt	2603,27	33			
Malat	zwischen den Gruppen	41351,39	1	41351,39	3,89	-
	innerhalb der Gruppen	350513,10	33	10621,60		
	insgesamt	391864,49	34			
α -KGS	zwischen den Gruppen	5768,15	1	5768,15	1,37	-
	innerhalb der Gruppen	134315,62	32	4197,36		
	insgesamt	140083,77	33			
Glutamat	zwischen den Gruppen	384,61	1	384,61	0,03	-
	innerhalb der Gruppen	313403,11	30	10446,77		
	insgesamt	313787,72	31			
Fumarat	zwischen den Gruppen	140444,66	1	140444,66	15,32	++
	innerhalb der Gruppen	302473,08	33	9165,85		
	insgesamt	442917,74	34			

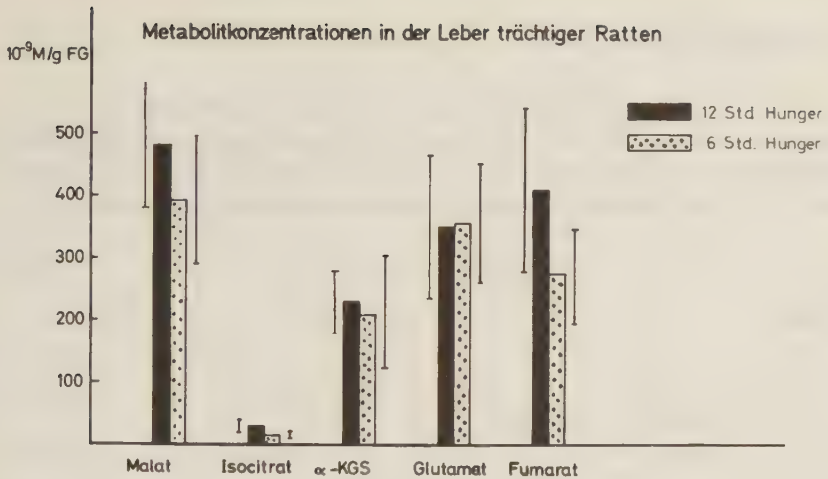


Abb. 3: Metabolitkonzentrationen in der Leber trächtiger Ratten mit 6- bzw. 12-stündiger Hungerzeit.

Tabelle 6 und Abbildung 3 zeigen für Isocitrat und Fumarat eine signifikante Konzentrationszunahme mit weniger als 1 % Irrtumswahrscheinlichkeit, während alle anderen in Tab. 6 aufgeführten Metaboliten keine signifikanten Unterschiede zeigten.

Für Acetyl-CoA gilt das gleiche wie vorher im Text zu Tab. 5 schon angeführt.

In den vorangegangenen statistischen Untersuchungen sollten eventuelle Metabolitkonzentrationsunterschiede zwischen trächtigen und nicht trächtigen Ratten, bzw. zwischen 2 verschiedenen Hungerzeiten, festgestellt werden. Die nun folgenden Tabellen sollen zeigen, ob eine Korrelation zwischen dem Gewicht trächtiger bzw. nicht trächtiger Ratten und den Metabolitkonzentrationen, bzw. zwischen Foetenlänge (= Dauer der Trächtigkeit) und Metabolitkonzentrationen, bei jeweils 6 und 12 Stunden Hunger besteht.

Datenbeschreibung

In der Datenbeschreibung sind Fallzahlen, Foetenlängen bzw. Rattengewichte, Mittelwerte und Standardabweichungen für alle trächtigen bzw. nicht trächtigen Tiere bei 6 und 12 Std. Hunger für alle untersuchten Metabolitkonzentrationen enthalten.

Tab. 7:

nicht trächtige Tiere mit 6-std. Hungerzeit				
Substrat	n	Gramm	$\bar{x}$	$\pm s$
Malat	12	150-380	270,00	89,96
Isocitrat	13	130-380	246,92	96,64
α -KGS	14	130-380	252,14	94,17
Glutamat	7	230-380	327,14	47,42
Fumarat	12	150-380	270,00	89,96

n = Anzahl der Tiere

$\bar{x}$ = Gruppenmittel (Rattengewicht)

s = Standardabweichung

Tab. 8:

nicht trächtige Tiere mit 12-std. Hungerzeit				
Substrat	n	Gramm	$\bar{x}$	$\pm s$
Malat	10	180-230	204,00	15,05
Isocitrat	10	180-230	204,00	15,05
α -KGS	10	180-230	204,00	15,05
Glutamat	10	180-230	204,00	15,05
Fumarat	10	180-230	204,00	15,05
Acetyl-CoA	13	180-230	202,30	17,86
Citrat	13	180-230	202,30	17,86

Tab. 9:

trächtige Ratten mit 6-std. Hungerzeit				
Substrat	n	mm	$\bar{x}$	$\pm s$
Malat	25	3-45	23,02	11,90
Isocitrat	24	3-44	22,10	11,23
α -KGS	24	3-44	22,10	11,23
Glutamat	22	3-44	23,11	10,94
Fumarat	25	3-44	23,02	11,90

n = Anzahl der Tiere
 $\bar{x}$ = Gruppenmittel (Foetenlänge)
 s = Standardabweichung

Tab. 10:

trächtige Ratten mit 12-std. Hungerzeit				
Substrat	n	mm	$\bar{x}$	$\pm s$
Malat	10	24-47	38,70	7,07
Isocitrat	10	24-47	38,70	7,07
α -KGS	10	24-47	38,70	7,07
Glutamat	10	24-47	38,70	7,07
Fumarat	10	24-47	38,70	7,07
Acetyl-CoA	13	8-47	33,69	11,32
Citrat	14	8-47	34,41	11,23

Folgende Rangkorrelationen wurden durchgeführt:

- I Rangkorrelation zwischen Rattengewicht (= Unabhängige x) und Substratkonzentration (= Abhängige y).
- II Rangkorrelation zwischen Foetenlänge (= Unabhängige x) und Substratkonzentration (= Abhängige y).

Tab. 11: Rangkorrelation zwischen Rattengewicht (= Unabhängige x) und Substratkonzentration (= Abhängige y)

nicht trächtige Tiere			trächtige Tiere	
Substrat	Hungerzeit	Tester- gebnis	Hungerzeit	Tester- gebnis
Malat	6 Std.	-	6 Std.	+
Isocitrat	"	-	"	+
α -KGS	"	-	"	-
Glutamat	"	-	"	-
Fumarat	"	-	"	-
Malat	12 Std.	-	12 Std.	-
Isocitrat	"	-	"	-
α -KGS	"	-	"	-
Glutamat	"	+	"	-
Fumarat	"	-	"	-
Acetyl-CoA	"	-	"	-
Citrat	"	-	"	-

+ = 5 % Niveau = statistisch auffällig

Tab. 12: Rangkorrelation zwischen Foetenlänge (= Unabhängige x) und Substratkonzentration (= Abhängige y)

Substrat	Hungerzeit	Testergebnis	Substrat	Hungerzeit	Testergebnis
Malat	6 Std.	-	Malat	12 Std.	-
Isocitrat	"	+	Isocitrat	"	-
α -KGS	"	-	α -KGS	"	+
Glutamat	"	-	Glutamat	"	-
Fumarat	"	-	Fumarat	"	-
			Acetyl-CoA	"	-
			Citrat	"	+

Aus Tab. 11 und 12 kann man folgendes entnehmen:

1. Glutamat zeigt in der Leber von nicht trächtigen Tieren mit einer 12-std. Nahrungskarenz eine auffällige Konzentrationszunahme mit zunehmendem Rattengewicht.
2. Bei trächtigen Tieren mit 6 Stunden Hunger haben wir mit steigendem Gewicht der Muttertiere für Malat und Isocitrat eine auffällige Konzentrationszunahme.
3. Für die Isocitratkonzentration im Lebergewebe von trächtigen Ratten mit einer Hungerzeit von 6 Stunden, besteht während der gesamten Gestationsdauer eine auffällige Zunahme.
4. Trächtige Ratten mit 12 Std. Hunger zeigten während der gesamten Trächtigkeitsdauer eine auffällige Abnahme der α -KGS-Konzentration und eine signifikante Konzentrationsabnahme bei Citrat.

Für alle anderen in Tab. 11 und 12 aufgeführten Metaboliten ließ sich kein statistisch gesichertes Testergebnis feststellen, wobei man allerdings nicht ausschließen kann, daß durch eine höhere Fallzahl bei einigen Metaboliten ein positives Testergebnis zu verzeichnen wäre.

F. DISKUSSION

Der Tricarbonsäurezyklus, 1937 etwa gleichzeitig von KREBS, MARTIUS und KNOOP entdeckt, stellt für die Endoxydation der Nahrungsstoffe, aber ebenso im Hinblick der synthetischen Leistung die "Drehscheibe des Stoffwechsels" dar. In ihn münden der Kohlenhydrat-, Eiweiß- und Fettstoffwechsel in Form der aktivierten Essigsäure ein; aus Acetyl-Coenzym A kondensiert der Acetylrest mit Oxalessigsäure zu Citronensäure.

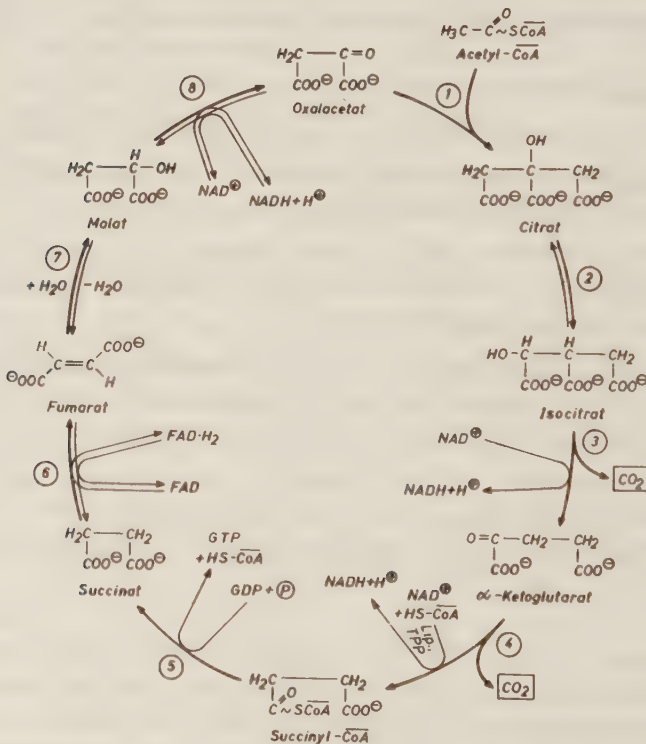


Abb. 7: Tricarbonsäurezyklus

Im weiteren Umsatz werden die Intermediärprodukte hydratisiert, dehydriert und decarboxyliert, wobei im Zyklus selbst pro Mol Substratumsatz, nur 1 ATP gewonnen wird, und zwar durch die oxydative Decarboxylierung der Ketoglutarsäure. Der größte Teil chemischer Energie wird durch die Dehydrierung der Substrate in Verbindung mit der Atmungskette geliefert (30).

Wir wissen, daß die einzelnen Schritte oder die Reaktionsfolgen im Tricarbonsäurezyklus erheblich variieren können, je nach dem physiologischen Zustand der Zelle. Geht beispielsweise ein Skelettmuskel, die Niere oder die Leber von der Ruhe in einen Zustand höherer Aktivität über, dann ist eine Zunahme der Energieversorgungsrate vorhanden, die vom Tricarbonsäurezyklus gewährleistet wird. Die Geschwindigkeit des Zyklus schwankt also je nach Energiebedarf der Zelle (33).

Der Tricarbonsäurezyklus stellt ein "Sammelbecken" besonderer Art dar. Er besitzt Verzweigungsstellen des Stoffwechsels bei Pyruvat, Acetat, Succinat, Oxalacetat und ATP, das gewissermaßen das Sammelbecken für chemische Energie darstellt. Man muß sich hierbei vor Augen halten, daß die stationäre Konzentration eines Metaboliten - also die Größe des "pools" - klein sein kann, obwohl viel Substanz umgesetzt wird (30).

Der erste Schritt des Zyklus ist, die Bildung von Citrat aus Oxalacetat und Acetyl-Coenzym-A. Gerade diese erste Zyklusreaktion kann durch ATP, wie KREBS (33) experimentell nachweisen konnte, gehemmt werden. Da die physiologische Aufgabe des Zyklus darin besteht, ATP zu produzieren, haben wir es hier mit einem Rückkopplungsmechanismus zu tun, d.h. die Menge des gebildeten Endproduktes, also ATP, steuert die Geschwindigkeit des Anfangsprozesses. Je weniger ATP, umso schneller der Zyklus. Den genauen Angriffspunkt von ATP stellt die Citratsynthase dar, deren Aktivität durch ATP gesteuert wird und somit der ganze Zyklusablauf von ATP als wahrscheinlichen Hauptregulator bestimmt wird.

Eine Verminderung der ATP-Bildung durch isolierte Mitochondrien aus Lebern alloxandibetischer Ratten sahen HALL et al. (24)

sowie bei pankreatektomierten Katzen VESTER und STADIE (61). Von mehreren Autoren wurde eine Verringerung der stationären ATP-Konzentration in der diabetischen Leber festgestellt (3,46).

Lebern schwer ketotischer Ratten weisen auch eine Erniedrigung des ATP/ADP-Quotienten auf (29).

Andererseits zeigen isolierte, perfundierte Lebern diabetischer Ratten keine erhöhte Abgabe von anorganischem Phosphat ins Perfusionsmedium und der ATP/ADP-Quotient weist nach 3-stündiger Perfusion gleiche Werte auf wie in Kontroll-Lebern (52).

Auch PARKS et al. (42) fanden in Lebern von 3 Wochen bis 6 Monaten alloxandiabetischer Ratten keine Erniedrigung des P/O-Quotienten.

Die Ergebnisse zeigen also Widersprüche, auch dort wo unter gleichen praktischen Versuchsanordnungen gearbeitet wurde.

Eine Abnahme der ATP-Konzentration in Abhängigkeit von der Länge der Hungerperiode bei Ratten fanden HELMREICH et al. (26).

THORN et al. (58) haben bei Hungerratten ebenfalls eine Verminderung von ATP gegenüber Kontrolltieren festgestellt. ATP-Konzentrationsveränderungen während der Gravidität konnten bislang nicht nachgewiesen werden.

Das Enzym Citratsynthase kann, wie WIELAND et al. (72,73) als auch gleichzeitig TUBBS (59) in ihren Untersuchungen nachweisen konnten, in empfindlicher Weise durch langkettige Acyl-Coenzym-A-Thioester gehemmt werden.

Die Anhäufung von solchen Acyl-Coenzym-A-Verbindungen langkettiger Fettsäuren in der Leber fanden bei hungernden Ratten BORTZ und LYNEN (5), sowie bei diabetischen Ratten WIELAND et al. (65).

Hält man sich vor Augen, daß der Mechanismus der Acyl-Coenzym-A-Hemmung einer Herabsetzung der Affinität der Citratsynthase gegenüber Oxalacetat gleichkommt, so gewinnt das Absinken des Oxalacetatspiegels in der Leber als zusätzlicher Faktor in der Ketoseentstehung an Bedeutung.

Konzentrationsänderungen, die sich normalerweise nicht oder nur wenig auf die Geschwindigkeit der Citratbildung auszuwirken

brauchten, könnten unter dem Einfluß der Coenzym-A-Thioester wirksam werden. Somit wäre in dem Gegenspiel von Acyl-Coenzym-A und Oxalacetat eine zelluläre Feinststeuerung des Tricarbonsäurezyklus gegeben, die schon auf geringe Konzentrationsänderungen dieser beiden Substrate anspricht (73).

Neuere Untersuchungen machen aber die Hemmung der Citratsynthase durch langkettiges Acyl-Coenzym-A fragwürdig. Es stellte sich erstens heraus, daß die Wirkung irreversibel ist und zweitens, daß sie unspezifisch abläuft (33). Eine physiologische Wirkung wäre damit sehr unwahrscheinlich.

Der Ablauf der einzelnen Reaktionsschritte im Tricarbonsäurezyklus ist auch von dem Angebot der Reaktionspartner Oxalacetat und Acetyl-Coenzym-A abhängig. Oxalacetat stellt einen der limitierenden Faktoren für die Einbeziehung von Acetyl-Coenzym-A in den Zyklus dar (30,33).

Wir haben an dieser Stelle einen Engpaß, der unter besonderen Bedingungen zu erheblichen Stoffwechselstörungen führen kann. Beim schweren Diabetes beispielsweise haben wir einmal eine verstärkte Fettsäurefreisetzung und damit eine Anhäufung von Acetyl-Coenzym-A (73) und andererseits eine Herabsetzung von Oxalacetat (33,67,68,69), die unter anderem dadurch bedingt ist, daß beim schweren Diabetes Glucose ungewöhnlich rasch synthetisiert wird. Oxalacetat ist eine normale Zwischenstufe in dieser Synthese, so daß der Oxalacetatspiegel absinken muß (33).

Die Folge ist eine Verlangsamung des Tricarbonsäurezyklus in der diabetischen Leber.

FROHMANN et al. (18) fanden eine Erniedrigung der stationären Metabolitenkonzentration des Tricarbonsäurezyklus in der Leber diabetischer Ratten, die sie aber auf eine Hemmung der Pyruvat-oxydation zurückführten.

Dagegen fanden CHERNICK et al. (78) die Oxydation von C^{14} -Fructose zu $C^{14}-O_2$ in der Leber diabetischer Ratten nicht herabgesetzt. Die gleichen Autoren fanden auch keine meßbar reduzierte Oxydation von C^{14} -Acetat. (9).

HARANO (25) fand die Enzymaktivitäten des Tricarbonsäurezyklus in den Mitochondrien diabetischer Ratten unverändert. Auch die Gesamtaktivität des Zyklus war, gemessen an der Succinat-Oxydation, nicht verändert.

Diese unterschiedlichen Befunde sind darauf zurückzuführen, daß die Untersuchungen einmal beim schweren Diabetes, also unter akuten Ketosebedingungen, zum anderen bei chronisch-alloxandibetischen Ratten, durchgeführt wurden.

WIELAND et al. (69) fanden in der Leber schwer diabetischer Ratten eine Erhöhung des Quotienten Malat/Oxalacetat, die durch eine Verringerung von Oxalacetat bei gleichzeitigem Anstieg von Malat bedingt ist. Die gleiche Beobachtung wurde bei dem Quotienten Lactat/Pyruvat gemacht. Den Abfall von Oxalacetat machten sie auf den Rückgang des mitochondrialen Redoxpotentials der Leber als Folge bevorzugter Fettsäureoxydation, verantwortlich. Der Abfall von NAD und Oxalacetat bedingt eine Blockierung des Acetyl-Coenzym-A-Eintritts in den Tricarbonsäurezyklus und damit eine Unterdrückung des Zyklus.

Im chronischen Stadium des Alloxandibabetes weisen die genannten Substratpaare dagegen keine Veränderungen auf, der Oxalacetatgehalt ist nicht herabgesetzt. Die Ursache liegt darin, daß keine Fettvorräte für die entscheidende Fettsäureoxydation mehr zur Verfügung stehen (50,70). Die Redoxquotienten haben bei diesen Tieren wieder die Norm erreicht. Die Acetatverbrennung über den Zyklus ist dabei nicht vermindert (69).

Man muß also diese beiden Stoffwechselgeschehen streng voneinander unterscheiden, da die Folgewirkungen auf den Tricarbonsäurezyklus grundverschieden sind.

Wichtig ist auch die Höhe des Pyruvatpools, die wohl nicht allein über die Menge der Einschleusung in den Zyklus entscheidet, aber dennoch sind eventuelle Änderungen im Substratangebot für die Startreaktion entscheidend.

RATHGEN et al. (45) stellten eine Erniedrigung der Pyruvatkonzentration in der Leber trächtiger Ratten fest.

THIELMANN et al. (57) fanden eine Verminderung der stationären Pyruvatkonzentrationen in der Leber alloxandiabetischer Mäuse und eine starke Herabsetzung des Pyruvatspiegels im Hungerzustand.

LAMPRECHT (36) konnte auch einen Konzentrationsabfall von Pyruvat in der Leber hungernder Ratten finden.

Wir wissen, daß Pyruvat über zwei verschiedene Wege in den Tricarbonsäurezyklus einmünden kann (15):

1. Über eine Dicarbonsäure, die durch Kondensation mit CO_2 entsteht.
2. Durch die oxydative Decarboxylierung zu Acetyl-Coenzym-A.

In der Fetalen- und Erwachsenenleber geht Pyruvat größtenteils als Acetyl-Coenzym-A in den Zyklus über, in der Neugeborenenleber als Dicarbonsäure (16).

FREEDMAN et al. (15) haben beobachtet, daß im Hungerzustand vermehrt Dicarbonsäuren an Stelle von Acetyl-Coenzym-A in den Zyklus eingehen, also ein Wechsel der Pyruvateinschleusung stattgefunden hat.

Wenn Pyruvat als Dicarbonsäure in den Zyklus einmündet, dann steigt die Konzentration der Intermediate und diese stehen vermehrt für Synthesezwecke zur Verfügung. Tritt Pyruvat dagegen als Acetyl-Coenzym-A in den Zyklus ein, so kommt es zu keinem Anstieg der Intermediate und der Ablauf des Tricarbonsäurezyklus kann lediglich für Energiegewinnung genutzt werden.

Durch das Einschleusen als Dicarbonsäure steht einmal mehr Glutamat und Aspartat für die Proteinsynthese zur Verfügung und zum anderen kann, da die Konzentration der Intermediate stark erhöht ist, vermehrt Acetyl-Coenzym-A umgesetzt und dadurch im größeren Umfang Energie gewonnen werden. Dabei spielt es keine Rolle ob Acetyl-Coenzym-A vom Kohlenhydrat- oder Fettstoffwechsel abstammt (15).

Die von uns im Hungerzustand von normalen und trächtigen Ratten erhöht gefundenen Metabolitkonzentrationen des Tricarbonsäure-

zyklus könnten z.T. auf diese Weise erklärt werden.

Die gefundenen Pyruvatkonzentrationserniedrigungen bei hungernen Ratten, brauchten aufgrund der bevorzugten Einschleusung von Pyruvat als Dicarbonsäure in den Zyklus und der damit verbundenen Erhöhung des Metabolitspiegels, keinen entscheidenden Einfluß im Sinne einer Konzentrationsabnahme zu haben.

Dem Acetyl-Coenzym-A-Anstieg während des Fastens dürfte ebenfalls eine nicht zu unterschätzende Bedeutung bei dem Anstieg der Metabolitkonzentrationen zukommen, da es für die Initialreaktion vermehrt zur Verfügung steht.

TUBBS (59) konnte einen Acetyl-Coenzym-A-Anstieg nicht nur beim Diabetes sondern auch in der Hungerperiode feststellen.

In unseren Versuchen konnten wir dies für die Hungerzeit sowohl bei Normaltieren als auch bei schwangeren Ratten bestätigen.

Einen Acetyl-Coenzym-A-Anstieg allein in bezug auf die Schwangerschaft konnte allerdings nicht nachgewiesen werden.

Die Ursache für die Anhäufung von Acetyl-Coenzym-A kann verschiedener Natur sein.

NUMA et al (41) fanden in der Leber 48 Std. fastender Ratten eine Verminderung des Enzyms Acetyl-Carboxylase, das die Geschwindigkeit der Biosynthese höherer Fettsäuren begrenzt. MATSUHASHI et al. (38) stellten fest, daß dieses Enzym Malonyl-Coenzym-A aus Acetyl-Coenzym-A, CO_2 und ATP synthetisiert, daß aber noch Citronensäure oder Isocitronensäure als Cofaktoren benötigt werden. Auch andere Säuren des Tricarbonsäurezyklus können eine Aktivierung der Carboxylierung bewirken, wenn auch erst bei sehr viel höheren Konzentrationen, so daß sie physiologisch kaum wirksam sein dürften.

Es ist allerdings noch unklar, ob der Citrateffekt der Carboxylierungsreaktion von physiologischer Bedeutung ist, denn die Konzentration von Citrat, in der es in vitro wirksam ist, liegt um ein Vielfaches höher als die in der normalen Leber vorkommende. Dem Citrat also eine entscheidende Rolle als Gegenspieler des Palmityl-Coenzym-A in der normalen, lebenden Zelle zuzuschreiben, ist damit stark in Frage gestellt (73).

SPENCER et al. (54) stellten eine weitgehende Konstanz des Citratgehaltes in der Leber von hungernden Ratten fest. WILLIAMSON (74) fand dagegen einen erhöhten Citratspiegel in der Leber von Hungerratten.

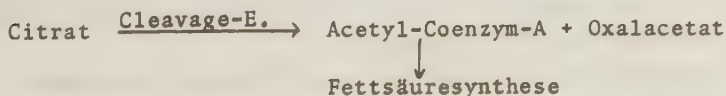
Zu dem gleichen Ergebnis kamen auch GARLAND et al. (19). Sie fanden außerdem den Citratspiegel in der Leber von diabetischen Ratten erhöht.

Veränderungen des Steroidhaushaltes, wie sie beispielsweise im schwangeren Organismus vorkommen, könnten im Laufe der Trächtigkeit ebenfalls eine Konzentrationsänderung von Citrat bewirken, da Cortisol über eine Enzyminduktion einen Anstieg von Citrat bewirkt (49).

Wir haben in unseren Untersuchungen Isocitrat, das in einem bestimmten Gleichgewichtszustand zu Citrat steht, bei schwangeren Tieren gegenüber Normaltieren, beide Vergleichsgruppen hungerten 6 Std., erhöht gefunden. Bei 12 Std. Hunger konnten wir diesen Unterschied allerdings nicht mehr feststellen.

Die Ursache könnte darin liegen, daß der von uns gefundene Citratgehalt bei schwangeren Ratten, die 12 Std. hungerten, während der gesamten Gestation eine Abnahme erfährt.

Citrat ist nicht nur das Initialprodukt des Tricarbonsäurezyklus sondern fungiert auch als Vorläufer von Acetyl-Coenzym-A bei der Fettsäuresynthese. Den Beweis dafür liefert die Einlagerung von Citrat-Kohlenstoff in die Fettsäuren. Die entscheidende Reaktion ist die Spaltung von Citrat zu Acetyl-Coenzym-A + Oxalacetat unter Mitwirkung des "Cleavage-Enzyms" (ATP-Citrat-Lyase (54)).



Dieses citratspaltende Enzym ist in der Leber von hungernden (1,51) und diabetischen Ratten (51) gegenüber der Norm stark erniedrigt.

Diese Erscheinung könnte den Anstieg in der Leber von hungernen und diabetischen Ratten wenigstens zum Teil erklären. Ebenso wäre es vielleicht möglich, daß speziell in diesen Stoffwechselsituationen dem Citrat doch eine physiologische Bedeutung als Gegenspieler von Palmityl-Coenzym-A zukommen würde.

Die bei Hunger und Diabetes erhöhte Fettsäuremobilisation (73) und der gleichzeitige Anstieg der entsprechenden Coenzym-A-Thioester (5,65), die nun ihrerseits eine Hemmwirkung auf die Enzyme Acetyl-Coenzym-A-Carboxylase (6) und Citratsynthase (59,71,72) entfalten, verlegen hierdurch den Weg der Fettsäuresynthese und der Citronensäurekondensation mit der Folge, daß Acetyl-Coenzym-A ansteigt und sich nach der Seite der Acetessigsäurebildung hin abreagieren muß. Die enzymatische Steuerung durch ein gemeinsames Prinzip dieser Art erscheint physiologisch gesehen durchaus sinnvoll, indem im Hunger die Endoxydation der Essigsäure und ihre Verwendung zur Lipidsynthese zugunsten der Bereitstellung von Acetessigsäure bzw. β -Oxybuttersäure, die als Brennstoffe in den extrahepatischen Organen benötigt werden, unterdrückt wird. Erst durch Störung der hormonell gesteuerten Fettsäuremobilisation, wobei das Gegenpiel Adrenalin und Insulin entscheidend beteiligt ist - wie etwa beim schweren, dekompensierten Diabetes mellitus - kann die Regulation in den pathologischen Zustand der Ketoazidose überführen (73).

WIELAND (66) konnte feststellen, daß die Endoxydation von Acetyl-Coenzym-A über den Tricarbonsäurezyklus in der Ketonkörper produzierenden Leber mehr und mehr unterdrückt ist. Es kommt mit zunehmender Acetessigsäurebildung zu einer ausgeprägten Hemmung der CO_2 -Produktion.

Der Anstieg von Acetyl-Coenzym-A und, wie schon an vorangegangener Stelle erwähnt, das erschwerte Einschleusen in den Zyklus, bedingt eine Umwandlung in Ketonkörper und als solche eine Eliminierung.

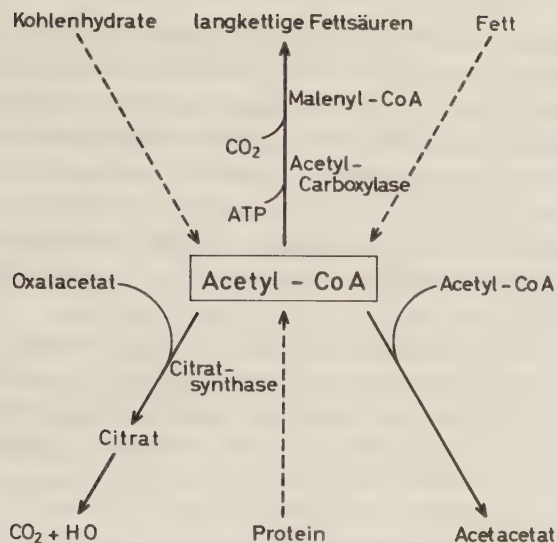
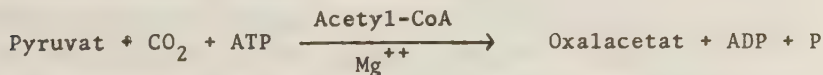


Abb. 8: Wege des Acetyl-CoA im Stoffwechsel der Leber

Die Bedeutung des Acetyl-Coenzym-A in der Ketogenese, sowie auch als Kondensationspartner des Oxalacetats für die Startreaktion des Tricarbonsäurezyklus ist aus den vorangegangenen Erörterungen zu erkennen.

Dem Acetyl-Coenzym-A kommt auch als Aktivator der Pyruvatcarboxylase und somit für die Umkehr der Glykolyse von Pyruvat eine nicht zu unterschätzende Bedeutung zu (60). Es ist also zu erwarten, daß bei einem Anstieg von Acetyl-Coenzym-A auch die Aktivität der Pyruvatcarboxylase anwächst.



Diese Betrachtung zeigt uns hiermit noch einen anderen interessanten Weg, der über die Bildung von Oxalacetat die Initialreaktion des Tricarbonsäurezyklus zu kontrollieren vermag.

Einen Nachweis von Acetonkörpern im Harn schwangerer Frauen findet man bei der Hyperemesis gravidarum schon nach wenigen

Tage fehlender Nahrungsaufnahme.

Man hat Blutzuckerbestimmungen jeweils nach 12, 24, 36, 48 Stunden Hunger durchgeführt. Es zeigte sich, daß 12 Std. Hunger bei Spätgraviden noch ähnliche Werte ergaben als bei Nichtschwangeren; dagegen führte 48-stündiges Fasten in der Gravidität zu erheblich niedrigeren Blutzuckerwerten, die bis unter 40 mg% absanken und zu einer Acetonurie. Eine experimentelle Inanition scheint also während der Schwangerschaft auf den intermediären Stoffwechsel einen anderen Einfluß zu nehmen als außerhalb der Schwangerschaft (17).

Die Erklärung dieser Erscheinung könnte unter anderen darin liegen, daß der schwangere Organismus, der durch verstärkte Glykogenolyse seine Reserven aufbraucht um den Ansprüchen der Frucht gerecht zu werden, bei Kohlenhydratentzug schneller an Kohlenhydrat verarmen wird als dies bei nicht schwangeren Personen der Fall ist (14).

Die Umsetzung anfallender Ketonkörper ist an die Anwesenheit von Kohlenhydraten gebunden. Somit könnte die oben erwähnte Acetonurie in der Schwangerschaft bei Inanition erklärt werden.

RATHGEN et al. (45) fanden während der Gestation eine Herabsetzung des Glucosegehaltes der Leber um mehr als 50 % und im peripheren Blut um mehr als 30 % im Vergleich zum Normalwert. Vergleicht man, in bezug auf das oben Gesagte, die Früh- von der Spätschwangerschaft, so kann man sich dahingehend äußern, daß die Glykogenverarmung in der Spätschwangerschaft noch erheblich stärker ist als zu einem früheren Zeitpunkt, da die Frucht erheblich an Größe zugenommen hat und an den Stoffwechsel der Mutter gesteigerte Forderungen stellt.

Man hat bei hungernden Ratten in der Schwangerschaft eine Entwicklung von Hypoglykämie, einer Ketose und einer Hyperlipämie festgestellt (48). Die Hyperlipämie war hauptsächlich durch das Anwachsen von freien Fettsäuren im Plasma bedingt. Die Ketose und die Hyperlipämie konnten durch Zugabe von Insulin beseitigt werden. Das zeigt, daß die anwachsende Fettmobilisation und Ketose bei hungernden, schwangeren Ratten auf einen Insulinmangel zurückzuführen ist.

Der hohe Verbrauch an Glucose durch den Föten reduziert den Glucosegehalt im mütterlichen Blut und damit ist der Glucose Spiegel zu gering (unter 42 mg/100 ml) um die Insulinsekretion während des Hungerns zu stimulieren (48). Die hierbei beobachtete Ketose stieg mit der Dauer der Schwangerschaft und der Zahl der Föten stark an.

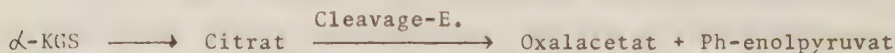
Die klassischen Zeichen des Insulinmangels, also des Diabetes, sind Hyperglycämie, Hyperketonämie, Hyperlipämie und Fettleber. Dies alles, außer der Hyperglycämie, entwickelt sich auch bei schwangeren Ratten die dem Hunger ausgesetzt sind. Der Hauptgrund, daß eine Hyperglycämie nicht in Erscheinung tritt, ist, daß die Hungerratte einen intakten Pankreas hat, welcher Insulin auszuschütten vermag (48).

Interessant ist in diesem Zusammenhang die von MADISON (37) gemachte Beobachtung, daß die Ketonkörper eine direkte β -zytotrope Wirkung entfalten. Im Hungerzustand könnte so der stimulatorische Effekt der Ketone als eine Art von Rückkopplungsmechanismus über die Ausschüttung von Insulin und die dadurch bedingte Senkung des unveresterten Fettsäurespiegels, die während des Fastens den hauptsächlichen Brennstoff für den Organismus darstellen, die Entwicklung einer fatalen Ketoazidose verhindern.

Die Ketoglutarsäure, ein wichtiges Bindeglied im Tricarbonsäurezyklus, nimmt ebenfalls eine zentrale Stellung in diesem Zyklus ein, die durch zwei Eigenschaften begründet ist. Im Verlauf der oxydativen Decarboxylierung der α -Ketoglutarsäure wird, wie oben schon erwähnt, nur an dieser Stelle des Zyklus Energie in Form von 1 ATP frei (30). Außerdem ist die α -Ketoglutarsäure Ausgangsstelle von Transaminierungsvorgängen. Damit ermöglicht sie als NH_2 -Akzeptor über die Bildung von Glutaminsäure (oder Asparaginsäure) die Überführung des Stickstoffs in das Ausscheidungsprodukt Harnstoff. Eine verstärkte Harnstoffbildung ist bei diabetischen Ratten sowohl in vivo (4) als auch in vitro nachgewiesen worden (22). Weiter steht die α -Ketoglutarsäure auf umgekehrtem Weg als Baugerüst für eine Reihe von Aminosäuren zur Verfügung (30).

Die oxydative Decarboxylierung der α -Ketoglutar säure zu Succinyl-Coenzym-A ist irreversibel. Eine Synthese von Citrat, ausgehend von Succinyl-Coenzym-A durch Umkehr des Tricarbonsäurezyklus ist demnach nicht möglich. Dagegen scheint die Umkehr des Zyklus ausgehend von der α -Ketoglutar säure möglich (30).

Speziell bei Zuständen mit Proteinmobilisation und damit einem Anwachsen von Glutamat, Prolin, Arginin, Ornithin und Histidin ist ein neuer Weg der Gluconeogenese gegeben.



Jedoch wurde in perfundierten Lebern von hungernden Ratten dieser Weg gehemmt gefunden (10). Dafür spricht auch, wie schon vorher erwähnt, die Konzentrationserniedrigung des citratspalten- den Enzyms, bei Hunger und Diabetes.

Dagegen wurde die Malat-Dehydrogenase- und die Glutamat-Oxalacetat-Transaminase-Aktivität, welche die Umwandlung von Malat und Aspartat zu Oxalacetat katalysieren, bei Diabetes und Hunger erhöht gefunden. Die Rate von Ph-enolpyruvat von Malat und Aspartat ist in der Leber von diabetischen und hungernden Ratten erhöht.

Es scheint deshalb, daß bei diabetischen und hungernden Ratten Aspartat und Malat bessere Vorläufer der Glucose sind als Citrat (63).

Wir konnten einen Anstieg des Malatspiegels in der Leber hungerner sowie auch trächtiger Ratten feststellen. KLUG (32) konnte eine Zunahme der Malat-Dehydrogenase-Aktivität in der Leber von hungernden und schwangeren Ratten feststellen, was unsere Ergebnisse bestätigt.

Da in diesen Stoffwechselsituationen eine vermehrte Glukoneogenese in der Leber zu verzeichnen ist, wäre der Anstieg von Malat und der Malat-Dehydrogenase-Aktivität eine physiologisch zu erwartende Reaktion.

Zusammenfassend kann man sagen, daß alle Aminosäuren, deren Überführung in Oxalessigsäure möglich ist, im Sinne der Gluconeogenese verwertbar sind. Für die Mehrzahl der glucogenen Aminosäuren ist dies auf dem Weg über den Tricarbonsäurezyklus möglich.

DAWSON et al. (11) sowie STROHMEIER et al. (56) berichten übereinstimmend von einer signifikanten Erhöhung der α -Ketoglutar-säure im Blut bei Patienten mit chronischen Lebererkrankungen.

KYANK und SCHLUND (34,47) berichten keine wesentliche Unterschiede des α -Ketoglutar-säurespiegels im Blut gesunder Nichtschwangerer und gesunder Schwangerer gefunden zu haben.

Erst zu Beginn der Eröffnungsperiode mit Einsetzen der Wehen bis zur Geburt steigen die α -Ketoglutar-säurewerte im Blut kontinuierlich an und erreichen ihren höchsten Wert unter der Geburt.

Auffallend ist aber der α -Ketoglutar-säureabfall im Blut während der Schwangerschaft, der von GESTALDI (20) unter Glucose-Belastung bei normalen Schwangeren beobachtet wurde.

Der α -Ketoglutar-säurespiegel in der Leber schwangerer Ratten, die 6 Std. hungerten, war bei unseren Untersuchungen erhöht. Bei einer Hungerzeit von 12 Std. konnte kein Unterschied beider Vergleichsreihen festgestellt werden. Dafür spricht, daß einmal der α -Ketoglutar-säurespiegel in der Leber von Normaltieren, die 12 Std. hungerten, stark gegenüber den 6 Std.-Werten ansteigt und zum anderen, daß der α -Ketoglutar-säuregehalt in der Leber schwangerer Ratten mit 12-stündiger Hungerzeit im Verlauf der gesamten Schwangerschaft abnimmt.

Die zuletzt genannte Erscheinung kann natürlich sekundär durch den ebenfalls erniedrigten Citrat- bzw. Isocitratgehalt dieser Tiere bedingt sein.

Änderungen des stationären Metabolitgehaltes im Tricarbonsäurezyklus brauchen nicht ausschließlich ihre Ursachen in einer Konzentrationsänderung der Ausgangsstoffe Oxalacetat und Acetyl-Coenzym-A zu haben, sondern sind, wie auch schon vorher bei der α -Ketoglutar-säure kurz skizziert, in einem gewissen Maß von sogenannten Nebenschlüssen abhängig.

Bei dem Abbau aromatischer Aminosäuren entsteht Fumarat, das auch aus Asparaginsäure im Harnstoffzyklus entsteht. Ebenso ist Fumarat ein Bruchstück des Tyrosinabbaus.

Wir fanden den Fumaratgehalt in der Leber hungernder und schwangerer Ratten erhöht.

Leucin, Isoleucin, Alanin und Valin können beispielsweise durch die oxydative Decarboxylierung über Acetyl-Coenzym-A in den Tricarbonsäurezyklus eingehen.

Histidin, Arginin sowie Prolin gehen in Glutaminsäure über und damit ist ebenfalls der Anschluß an den Tricarbonsäurezyklus gegeben.

Eine veränderte Gesamtamino-säurebilanz ließ sich an der isolierten, perfundierten Leber diabetischer Ratten nicht nachweisen (21), jedoch ist beim Diabetiker eine vermehrte Aminosäureausscheidung im Urin nachweisbar (40). Schließlich ist der Gesamtstoffwechsel der diabetischen Leber in Richtung auf einen verstärkten Katabolismus verschoben (43).

Daß die Kohlenstoffketten vieler Aminosäuren in den Zyklus münden, hat nicht nur für den Endabbau, sondern auch für den Übergang in Zucker eine nicht zu unterschätzende Bedeutung (30).

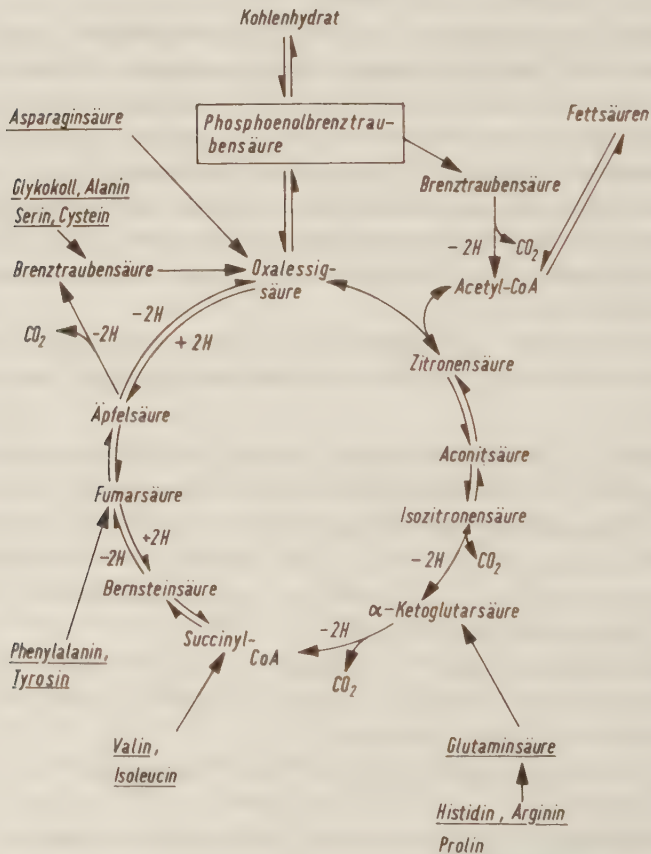


Abb. 9: Stellung der glucogenen Aminosäuren im Intermediärstoffwechsel

Diese angeführten Stoffwechselreaktionen können in der Schwangerschaft erhöhten Schwankungen unterworfen sein. Alle mütterlichen Regulationsvorgänge, die der physiologischen Aufgabe der Gravidität angepaßt sind, haben anscheinend eine erhöhte Labilität, die sich wiederum auf verschiedene Stoffwechselgeschehen auswirken kann.

Wir haben in der Gravidität nicht nur eine Erhöhung der weiblichen Geschlechtshormone, sondern auch durch eine gesteigerte Aktivität der Nebennierenrinde eine Erhöhung von Cortison, Cortexon und Aldosteron, die andererseits wieder einen Einfluß auf die Stoffwechselvorgänge haben können. Man neigt heute dazu, den sicher veränderten Ablauf von Glucose- oder Hungerbelastungen während der Schwangerschaft durch die stark erhöhte Produktion von Nebennierensteroiden, welche die Gluconeogenese fördern, zu erklären. Zwischen der Corticosteroidmenge im Blut und der Menge Insulin, die produziert werden muß, bestünde ein quantitatives Verhältnis, so daß an sich jede Schwangerschaft schon als eine Glucosebelastung wirke (17).

Cortisol, das auch im Hunger vermehrt ausgeschüttet wird, fördert beispielsweise nicht nur die Gluconeogenese über eine Enzyminduktion, sondern erhöht auch den Aminosäurenspiegel im Plasma (49).

Weiter wird die Phosphorylaseaktivität unter Cortisoneinfluß gehemmt (31). POHL (44) stellte fest, daß Cortison durch eine Hemmung des Enzyms Coenzym-A eine Anhäufung von Pyruvat bewirkt. Die Folge dieser Enzymhemmung ist eine verminderte Zyklusoxydation und somit eine herabgesetzte Tätigkeit des Tricarbonsäurezyklus.

Der gleiche Autor konnte in der Rattenleber unter Insulinbelastung keine Erhöhung des Pyruvatspiegels feststellen, was auch im Hinblick auf die Insulinwirkung nicht verwunderlich ist. Aus dem Pyruvatpool werden dauernd Mengen für die Glykogen-, Fett- und Proteinsynthese entnommen. In der gleichen Versuchsanordnung konnte er eine wesentliche Herabsetzung der Überführung von Pyruvat in den Tricarbonsäurezyklus feststellen, was auch der verminderte O_2 -Verbrauch einiger Intermediate untermauert.

FLATT und BALL (13) haben berechnet, daß ohne Insulin ungefähr 50 % der Glucose im Krebs-Zyklus oxydiert wird und unter maximaler Insulinstimulierung nur noch ca. 7 %. Mit Ausnahme des Krebs-Zyklus werden alle Abbauege der Glucose durch Insulin stimuliert.

Im Hinblick auf den Zustand der Gravidität und der Beeinflussung des Krebs-Zyklus ist es interessant, daß der Plasmainsulinspiegel während der Gravidität erhöht ist (53), aber während einer Hungerperiode in der Gravidität und mit der Anzahl der Föten abfällt (48).

Schließlich gehen verschiedene ^{14}C -markierte intermediäre Stoffe des Tricarbonsäurezyklus unter Insulineinfluß beschleunigt mit ihren ^{14}C in Asparagin und Glutaminsäure über (55).

Aus diesen Versuchen ersieht man, daß nicht nur eine Selbststeuerung im "Sinne des Ferment-Substrat-Gleichgewichtes", sondern auch eine hormonale Fremdsteuerung des Tricarbonsäurezyklus vonstatten geht.

Aufgrund unserer Untersuchungen kann man sagen, daß in bezug auf den Tricarbonsäurezyklus eine weitgehende Übereinstimmung zwischen der Hungerleber und Schwangerschaftsleber bei Ratten besteht. Beide Stoffwechselsituationen zeigen eine Erhöhung der Intermediate des Tricarbonsäurezyklus in der Leber, deren Ursache bei der Hungerleber in dem erniedrigten ATP- und dem erhöhten Acetyl-Coenzym-A-Gehalt sowie dem bevorzugten Übergang des Pyruvats als Dicarbonsäure in den Tricarbonsäurezyklus, zumindest teilweise liegen dürfte.

Eine ursächliche Erklärung für die von uns gefundene Erhöhung der Zyklusintermediate in der Schwangerschaftsleber von Ratten läßt sich aufgrund dieser Arbeit nicht geben. Hier müssen weitergehende Untersuchungen angestellt werden, die speziell an den Verzweigungsstellen des Tricarbonsäurezyklus ansetzen müssen, wobei man auch die Vielfalt der Beeinflussung des Zyklus ins Auge fassen muß.

Eine Übereinstimmung im Verhalten der Zyklusintermediate zwischen diabetischer- und Schwangerschaftsleber läßt sich nur vereinzelt nachweisen.

Malat, das von WIELAND et al. (69) in der diabetischen Leber erhöht gefunden wurde, zeigte auch in unseren Untersuchungen eine Erhöhung in der Schwangerschaftsleber, gegenüber von Normaltieren. Das gleiche läßt sich auch für Citrat bzw. für Isocitrat aussagen. Andererseits wurde aber bei Untersuchungen der Zyklusaktivität in der Leber diabetischer Ratten von keinem Autor eine Erhöhung der Intermediate gefunden.

Wir sehen, daß einige Verknüpfungspunkte vorhanden sind, die aber nicht ausreichen, um von einem gleichsinnigen Verhalten der Zyklusintermediate bei diabetischer- und Schwangerschaftsleber zu sprechen.

Da die Parameter des KH-Abbaus in der diabetischen und Schwangerschaftsleber von Ratten weitgehend übereinstimmen (45), muß man die Ursache für das divergierende Verhalten der Intermediate des Tricarbonsäurezyklus an anderer Stelle suchen.

G. ZUSAMMENFASSUNG

In der Leber trächtiger Ratten finden sich im Vergleich zu Normaltieren bei jeweils 6-stündigem Nahrungsentzug auffällig erhöhte Werte von Malat, Isocitrat, α -Ketoglutar säure und Fumarat. Bei Glutamat ist kein Unterschied festzustellen.

Bei einer Hungerzeit von 12 Stunden fanden wir keinen signifikanten Unterschied beider Vergleichsreihen.

Es zeigte sich außerdem im Lebergewebe trächtiger Ratten, die 6 Stunden hungerten, eine auffällige Korrelation des erhöhten Isocitratspiegels zur Dauer der Trächtigkeit. Für die anderen Metaboliten konnte dies statistisch nicht gesichert werden. Bei 12 Stunden Hunger fanden wir eine Abnahme des α -Ketoglutar säure- und Citratgehaltes im Verlauf der gesamten Schwangerschaft.

Für Malat und Isocitrat fanden wir in der Leber trächtiger Ratten mit einer 6-stündigen Hungerzeit einen Anstieg der Konzentration in bezug auf das steigende Muttergewicht. Glutamat zeigte bei nicht trächtigen Ratten mit 12-stündiger Hungerzeit eine Konzentrationszunahme mit steigendem Rattengewicht.

Eine weitere Untersuchung, die den Einfluß verschieden langer Hungerzeiten auf den Metabolitgehalt des Tricarbonsäurezyklus feststellen sollte, zeigte bei Normaltieren eine deutliche Zunahme von Malat, Isocitrat, α -Ketoglutar säure, Fumarat und Acetyl-Coenzym-A bei einer Nahrungskarenz von 12 Stunden gegenüber einer von 6 Stunden.

Bei trächtigen Tieren fanden wir unter gleicher Versuchsanordnung einen Anstieg des Isocitrat-, Fumarat- und Acetyl-Coenzym-A-Gehaltes.

Bei Acetyl-Coenzym-A bezieht sich allerdings der Vergleich auf den Substratgehalt im bluthaltigen Lebergewebe. Wir konnten wohl Acetyl-Coenzym-A im Blut nachweisen, da aber der korrigierte Wert in seiner Größenordnung nicht von dem unkorrigierten Wert abweicht, genügt diese Aussage für unsere Fragestellung.

H. LITERATURVERZEICHNIS

- (1) Abraham, S., L. Kopelovich und I.L. Chaikoff:
Dietary and hormonal regulation of the hepatic citrate-cleavage enzyme, *Biochem.Biophys.Acta* 93, 185-187 (1964).
- (2) Bergmeyer, H.U.:
Methoden der enzymatischen Analyse, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr. (1964).
- (3) Blaylock, B.H., E. Rothrock und J. Sacks:
Alloxan diabetes, insulin and adenosine phosphates of liver, *Amer.J.Physiol.* 198, 1063-1065 (1960).
- (4) Bondy, P.K.:
Patients with diabetic ketosis, before and after the administration of insulin, *J.Clin.Invest.* 28, 1126-1132 (1949).
- (5) Bortz, W.M. und F.Lynen:
Elevation of long chain acyl-coenzym A derivatives in liver of fasted rats, *Biochem.Z.* 337, 505-509 (1963).
- (6) Bortz, W.M. und F.Lynen:
The inhibition of acetyl-coenzym A carboxylase by long chain acyl-coenzym A derivatives, *Biochem.Z.* 339, 77-82 (1963).
- (7) Chernick, S.S. und J.L.Chaikoff:
Insulin and hepatic utilization of glucose for lipogenesis, *J.Biol.Chem.* 186, 535-542 (1950).
- (8) Chernick, S.S. und R.O.Scow:
Synthesis in vitro of glyceride-glycerol by the liver of normal and pankreatectomized rats, *J.Biol.Chem.* 239, 2416-19 (1964).
- (9) Chernick, S.S. und I.L.Chaikoff:
Two blocks in carbohydrate utilisation in the liver of the diabetic rat, *J.Biol.Chem.* 188, 389-396 (1951)

- (10) D'adamo, A.F. und D.E.Haft:
An alternate pathway of α -Ketoglutarate Catabolism in the isolated perfused rat liver, J.Biol.Chem. 240, 613-617 (1965)
- (11) Dawson, A.M., J.DE-Groote, W.S.Rosenthal und S.Sherlock:
Blood pyruvic-acid and alpha-ketoglutaric-acid levels in liver disease and hepatic coma, Lancet 272, 392-398 (1957).
- (12) Dietel, H.:
Das Bild der Leber in der Schwangerschaft. Geburtshilfe und Frauenheilkunde 12, 525-527 (1952).
- (13) Flatt, J.P. und E.G.Ball:
Studies on the metabolism of adipose tissue, J.Biol.Chem. 239, 675-85 (1964).
- (14) Föllmer, W.:
Das Verhalten der Ketonkörper während Zyklus und Schwangerschaft, Leipzig 1950.
- (15) Freedmann, A.D. und S.Graft:
The metabolism of pyruvate in the tricarboxylic acid cycle, J.Biol.Chem. 233, 292-95 (1958).
- (16) Freedmann, A.D. und A.M.Nemeth:
The metabolism of pyruvate in the tricarboxylic acid cycle of developing mammalian liver, J.Biol.Chem. 236, 3083-85 (1961).
- (17) Friedberg, V.:
Die Leberfunktion in der Schwangerschaft, Acta hepato-splenologica 7, 214-229 (1960).
- (18) Frohman, C.E. und J.M.Orten:
Tracer studies of the acids of the tricarboxylic acid cycle, J.Biol.Chem. 216, 795-99 (1955).
- (19) Garland, P.B. und P.J.Randle:
Regulation of glucose uptake by muscle, Biochem.J. 93, 678-87 (1964).
- (20) Gestaldi, A.:
Contributio allo studio des metabolism degli i drati di carbonio in gravidanza modificazioni ematiche dell acido piruvico ed alfa-cheto glutarico dopo carico di glucosio, Amer.J.Obstetr. 77, 385-396 (1955).

- (21) Green, M. und L.L.Miller:
Protein catabolism and protein synthesis in perfused
livers of normal and alloxan diabetic rats, J.Biol.Chem.
235, 3202-08 (1960).
- (22) Haft, D.E. und L.L.Miller:
Alloxan diabetes and demonstrated direct action of insulin
in metabolism of isolated perfused rat liver, Amer.J.
Physiol. 192, 33-42 (1958).
- (23) Hagemann, R.:
Ratte und Maus (Berlin 1960).
- (24) Hall, C.J.:
The effect of insulin on oxidative phosphorylation in
normal and diabetic mitochondria, J.Biol.Chem. 235,
1536-39 (1960).
- (25) Harano, Y.:
Fatty acid oxidation, citric acid cycle activity and
morphologie of mitochondria in diabetic rat liver,
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 131, 913-917 (1969).
- (26) Helmreich, E., H.Holzer, W.Lamprecht und St.Goldschmidt:
Bestimmung stationärer Zwischenstoffkonzentrationen.
II. Die Entstehung der Ketonkörper und ihre Beziehung zur
Glykolyse, Hoppe-Seylers Z.physiol.Chem. 297, 113-126 (1954).
- (27) Henneberg, M.:
Zitiert bei R.Hagemann in Ratte und Maus (Berlin 1960).
- (28) Hohorst, H.J., F.H.Kreutz und Th. Bücher:
Über Metabolitgehalte und Metabolitkonzentrationen in
der Leber der Ratte, Biochem.Z. 332, 18-46 (1959).
- (29) Hohorst, H.J., D.Stratmann und H.Bartels:
Über die Wirkung von Insulin auf den Reduktionszustand des
DPN-Systems und die Phosphorylierung der Adeninnucleotide
in der Leber, Klin.Wschr. 42, 245-246 (1964).
- (30) Karlson, P.:
Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Natur-
wissenschaftler, Thieme-Verlag, Stuttgart (1964).

- (31) Kerpolla, W.:
Inhibition of phosphorylase with cortisone and its
activation with adrenalin in the rabbit, *Endocrinology* 51,
192-202 (1951).
- (32) Klug, J.: Persönliche Mitteilung.
- (33) Krebs, H.A.:
Tagung der Nobelpreisträger für Medizin, Lindau, Juli 1969.
- (34) Kühn, H.A.:
Leber und Schwangerschaft, *Materia medica Nordmark* 17,
213-24 (1965).
- (35) Kyank, H.:
Alpha-Ketoglutarsäurebestimmung im Blut von normalen
Schwangeren und von Toxikosen sowie im Nabelschnurblut
und Fruchtwasser, *Zbl.Gynäk.* 80, 585-587 (1958).
- (36) Lamprecht, W.:
Stationäre Zwischenstoffkonzentrationen und ihre Bedeutung
für den intermediären Stoffwechsel, *Diss.TH.München* 1954.
- (37) Madison, L.L.:
The hypoglycemic action of ketones, 2. Evidence for a
stimulatory feedback of ketones on the pancreatic- β -cells,
J.Clin.Invest. 43, 408-415 (1964).
- (38) Matsushashi, M., S.Matsushashi und F.Lynen:
Zur Biosynthese von Fettsäuren, *Biochem.Z.* 340, 263-289
(1964).
- (39) Munnell, E.W. und H.C.Taylor: Liver blood flow in
pregnancy - hepatic vein catheterization.
J.Clin.Invest. 26, 952-56 (1947).
- (40) Müting, D.:
Die Rolle der Leber im Eiweißstoffwechsel und der Ent-
giftungsfunktion bei Prädiabetes und Diabetes mellitus,
Klin.Wschr. 40, 105-107 (1962).
- (41) Numa, S., M.Matsushashi und F.Lynen:
Zur Störung der Fettsäuresynthese bei Hunger- und Alloxan-
Diabetes, *Biochem.Z.* 334, 203-217 (1961).

- (42) Parks, R., E.J.Adler und J.H. Copenhaver:
The efficiency of oxydative phosphorylation in
mitochondria from diabetic rats, J.Biol.Chem. 214, 693-698
(1955).
- (43) Pfeifer, R.:
Handbuch des Diabetes Mellitus I
J.E.Lehmanns-Verlag München 1969.
- (44) Pohl, W.:
Der Zitronensäurezyklus unter vegetativen, hormonellen
und toxischen Reizen, Z.Ges.Innere Medizin 17, 768-775 (1962).
- (45) Rathgen, G.H., W.Baumann, C.C.Schümichen und V.Friedberg:
Untersuchungen zum Kohlenhydratstoffwechsel während der
Gestation, Arch.Gynäk. 208, 353-372 (1970).
- (46) Sacks, J.:
Alloxan diabetes and phosphate turnover in the liver,
Amer.J.Physiol. 172, 93-99 (1953).
- (47) Schlund, D.:
Die Brenztraubensäure und die alpha-Ketoglutarsäure im
Blut während der normalen Schwangerschaft, unter der
Geburt sowie beim Neugeborenen, Inaug.Diss. Mainz 1963.
- (48) Scow, R.O., S.S.Chernick und M.S.Brinley:
Hyperlipämia and ketosis in the pregnant rat, Amer.J.Physiol.
206, 796-804 (1964).
- (49) Seubert, W.:
Cortisol als Enzyminduktor mit besonderer Berücksichtigung
der Gluconeogenese. In: Wirkungsmechanismen der Hormone,
Springer-Verlag, Berlin 1967.
- (50) Shaw, W.V. und D.F.Tapley:
Oxalacetate in the livers of alloxan diabetic rats,
Biochim.Biophys.Acta (Amst.) 30, 426-27 (1958).
- (51) Shrago, E. und H.A.Lardy:
Path of carbon in gluconeogenesis and lipogenesis,
J.Biol.Chem. 241, 663-668 (1966).
- (52) Söling, H.D., R.Kattermann, H.Schmidt und P.Kneer:
The redox-state of NAD^+/NADH system in rat liver during
ketosis and the socalled "Triosephosphate Block",
Biochem.Biophys.Acta 115, 1-14 (1966).

- (53) Spellacy, W.N. und F.C.Goetz:
Plasmainsulin in normal late pregnancy,
New Engl.J.Med. 268, 988-991 (1963).
- (54) Spencer, A.F. und J.M.Löwenstein:
Citrate content of liver and kidney of rats in various
metabolic states and in fluoroacetate poisoning,
Biochem.J. 103, 342-348 (1967).
- (55) Staub, H.:
40 Jahre Insulin und intermediäre Stoffwechsel,
Klin.Wschr. 43, 61-69 (1964).
- (56) Strohmeier, G., G.A.Martini und V.Klingmüller:
Veränderungen von alpha-Ketoglutar säure, Brenztrauben-
säure und Diphosphorpyridinnucleotid bei chronischen
Leberkranken, Klin.Wschr. 35, 385-390 (1957).
- (57) Thielmann, K., H.Frunder, G.Richter und H.Börnig:
Der Stoffwechsel geschädigter Gewebe, Hoppe-Seylers Z.
physiol.Chem. 320, 58-74 (1960).
- (58) Thorn, W. und G.Jakobs:
Metabolitgehalt der Rattenleber nach Nahrungsentzug,
Biochem.Z. 335, 440-42 (1962).
- (59) Tubbs, P.K.:
Inhibition of citrate formation by long chain of acyl-
thioester of coenzyme A as a possible controle mechanism
in fatty acid biosynthesis, Biochim.biophys.Acta (Amst.)
70, 608-609 (1963).
- (60) Utter, M.F. und D.B.Keech:
Pyruvate Carboxylase, J.Biol.Chem. 238, 2603-08 (1963).
- (61) Vester, J.M. und W.C.Stadie:
Studies of oxidative phosphorylation by hepatic
mitochondria from the diabetic cat, J.Biol.Chem. 227,
669-676 (1957).
- (62) Wachter, H.P.:
Die Histometrie an Lebergewebe, Acta hepatica (Hbg.) 4,
16-27 (1956).

- (63) Walter, P., V.Peatkau und H.A.Lardy:
Path of carbon in gluconeogenesis and lipogenesis,
J.Biol.Chem. 241, 2523-39 (1966).
- (64) Warburg, O.:
Über die Kristallisation von Gärungsfermenten und ihre
optischen Teste, In: Wasserstoff übertragende Fermente,
Berlin 1948, Freiburg i.Br. 1949.
- (65) Wieland, O.:
Diabetics acidosis: Biochemical aspects. "On the nature
and treatment of diabetes." 5. Congr. of the Internat.
Diabetes Federation, Toronto 1964, Excerpta med. (Amst.)
Sect. 10.
- (66) Wieland, O.:
Ketone formation and inhibition of lipid synthesis by
chylomicrons, Life Sci. 7, 441-447 (1963).
- (67) Wieland, O. und G.Löffler:
Über den Mechanismus der gesteigerten Ketonkörperbildung,
Biochem.Z. 339, 204-11 (1963).
- (68) Wieland, O. und G.Löffler:
Beziehungen zwischen Leber-DPNH und Ketogenese in vivo,
Life Sci. 2, 55-59 (1962).
- (69) Wieland, O., G.Löffler und F.Matschinsky:
Über den Mechanismus der gesteigerten Ketonkörperbildung,
Biochem.Z. 342, 76-84 (1965).
- (70) Wieland, O., G.Löffler, L.Weiss und J.Neufeldt:
Zur Acetessigsäure und Cholesterinbildung bei experimen-
teller Ketose, Biochem.Z. 333, 10-22 (1960).
- (71) Wieland, O. und L.Weiss:
Inhibition of citrate-synthase by palmityl Coenzym A,
Biochem.biophys.Res.Comm. 13, 26-31 (1963).
- (72) Wieland, O., L.Weiss und J.Eger-Neufeldt:
Hemmung der enzymatischen Citronensäuresynthese durch
langkettige Acyl-Thioester des Coenzym A,
Biochem.Z. 339, 501-513 (1964).

- (73) Wieland, O., L.Weiss, J.Eger-Neufeldt, A.Teinzen und B.Westermann:
CoenzymA-Thioester höherer Fettsäuren als mögliche Vermittler enzymatischer Regulationen im Tierkörper, Klin.Wschr. 43, 645-54 (1965).
- (74) Williamson, J.R.:
Studies on the ketogenic effect of glucagon in intact rat liver, Biochem.Biophys.Res.Comm. 24, 437-441 (1966).
- (75) Sachs, L.:
Statistische Auswertungsmethoden, Springer-Verlag Berlin, 1972

Lebenslauf

Am 19. Februar 1944 wurde ich als Sohn des Architekten Lorenz Roßkopf und seiner Ehefrau Anna geb. Stork in Münster Kr. Dieburg geboren.

Von 1950 bis 1954 besuchte ich die Volksschule in Münster und von 1954 bis 1958 die Mittelschule in Dieburg. Danach wechselte ich auf das Naturwissenschaftliche Max-Planck-Gymnasium in Groß-Umstadt über, wo ich am 27.2.1964 die Reifeprüfung bestand. In der Zeit vom 1.4.1964 bis 31.3.1965 leistete ich meinen Wehrdienst ab.

Im Winter-Semester 1965/66 begann ich das Studium der Medizin an der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt, wo ich am 30.3.1966 die Naturwissenschaftliche Vorprüfung und am 24.7.1968 die Ärztliche Vorprüfung ablegte. Im Winter-Semester 1968/69 studierte ich ein Semester an der Medizinischen Fakultät der Universität Wien und ab Sommer-Semester 1969 an der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz, an der ich am 3.12.1971 die Ärztliche Prüfung mit der Note "sehr gut" ablegte. Seit 1.4.1972 arbeite ich als Medizinalassistent im St. Vincenz- und Elisabeth-Hospital in Mainz.

Seit 7.6.1972 bin ich mit Heidi geb. Skala verheiratet.

